

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ EKOTOXICITY VYBRANÝCH LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAN WEISS

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ EKOTOXICITY VYBRANÝCH LÉČIV

EVALUATION OF ECOTOXICITY OF SELECTED PHARMACEUTICALS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAN WEISS

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0292/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Jan Weiss	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí diplomové práce:	MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Posouzení ekotoxicity vybraných léčiv

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Stanovení ekotoxicity vybraných léčiv pomocí testů ekotoxicity na vhodných organismech
3. Posouzení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jan Weiss
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V poslední době vzrůstá spotřeba léčiv, a tudíž i množství jejich reziduí v přírodních ekosystémech. Je tedy nezbytné zabývat se i jejich případnými negativními vlivy na životní prostředí. Předložená diplomová práce je zaměřena na ekotoxikologické hodnocení farmak. Testovány byly diklofenak a ibuprofen ze skupiny nesteroidních protizánětlivých látek, penicilin G a ampicilin ze skupiny antibakteriálních látek. Protože se testované skupiny léčiv vyskytují převážně ve vodní složce životního prostředí, byly k hodnocení ekotoxicity použity především testy na vodních organismech. Testovacími organismy byly *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Artemia salina*, *Sinapis alba*, *Lemna minor* a *Brachionus calyciflorus*. Na základě výsledků provedených testů byly pro testované látky stanoveny hodnoty LC50, EC50 a IC50 a byla porovnána jejich ekotoxická.

ABSTRACT

In recent years consumption of drugs and thus the quantity of their residues in natural ecosystems is increasing. It is necessary to deal with their possible negative effects on the environment. This thesis is focused on the ecotoxicological evaluation of pharmaceuticals. Diclofenac and ibuprofen from the group of non-steroidal anti-inflammatory substances, penicillin G and ampicillin from the group of antibiotics were tested. Mainly tests on aquatic organisms were used to evaluate of ecotoxicity, because the tested pharmaceuticals are predominantly occurred in the aquatic environment. *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Artemia salina*, *Sinapis alba*, *Lemna minor*, and *Brachionus calyciflorus* were used as testing organisms. Values of LC50, EC50 and IC50 were determined and the ecotoxicity of pharmaceuticals was compared.

KLÍČOVÁ SLOVA

ekotoxická, testy ekotoxicity, léčiva, životní prostředí, ekosystém

KEYWORDS

ecotoxicity, tests of ecotoxicity, pharmaceuticals, environment, ecosystem

WEISS, J. *Posouzení ekotoxicity vybraných léčiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 79 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji tímto za cenné rady, připomínky a věnovaný čas odborným konzultacím při vypracování mé diplomové práce MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D.

OBSAH:

1.	ÚVOD	7
2.	CÍL PRÁCE	8
3.	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1.	Současný stav řešené problematiky	9
3.2.	Léčiva	10
3.2.1.	Nesteroidní protizánětlivé látky (NSPZL)	10
3.2.1.1.	Diklofenak	12
3.2.1.2.	Ibuprofen	14
3.2.2.	Antibakteriální látky (antibiotika)	15
3.2.2.1.	Ampicilin	17
3.2.2.2.	Penicilin G (benzylpenicilin)	18
3.3.	Osud a zdroje průniků reziduí léčiv do životního prostředí	20
3.3.1.	Humánní a veterinární aplikace	21
3.3.2.	Rezidua léčiv na ČOV	23
3.4.	Ekotoxikologie	24
3.4.1.	Experimentální metody hodnocení ekotoxicity	25
3.4.2.	Základní rozdělení testů toxicity	25
3.4.2.1.	Podle doby expozice	25
3.4.2.2.	Podle uspořádání testu	26
3.4.2.3.	Podle úrovně provedení	27
3.4.3.	Provedení ekotoxikologických testů	28
3.4.3.1.	Princip testů	28
3.4.3.2.	Plánování testu a interpretace dat	29
3.5.	Vybrané ekotoxikologické biotesty	31
3.5.1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis Alba</i>	31
3.5.2.	Daphtoxkit F TM	32
3.5.3.	Akutní test toxicity na žábronožkách <i>Artemia salina</i>	33
3.5.4.	Thamnotoxkit F TM	35
3.5.5.	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	36
3.5.6.	Rotoxkit F TM	37
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis Alba</i>	39
4.2.	Daphtoxkit F TM	40
4.3.	Akutní test toxicity na žábronožkách <i>Artemia salina</i>	41
4.4.	Thamnotoxkit F TM	43
4.5.	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	44
4.6.	Rotoxkit F TM	46
5.	VÝSLEDKY	47
5.1.	Referenční testy	47
5.2.	Limitní testy	50
5.3.	Diklofenak	50
5.3.1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	50
5.3.2.	Daphtoxkit F TM	51
5.3.3.	Akutní test toxicity na žábronožkách <i>Artemia salina</i>	52

5.3.4.	Thamnotoxkit F TM	53
5.3.5.	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	54
5.4.	Ibuprofen	55
5.4.1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	55
5.4.2.	Daphtoxkit F TM	56
5.4.3.	Akutní test toxicity na žábřonožkách <i>Artemia salina</i>	57
5.4.4.	Thamnotoxkit F TM	57
5.4.5.	Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i>	58
5.5.	Penicilin G	60
5.5.1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	60
5.5.2.	Daphtoxkit F TM	61
5.5.3.	Akutní test toxicity na žábřonožkách <i>Artemia salina</i>	62
5.5.4.	Thamnotoxkit F TM	62
5.6.	Ampicilin	64
5.6.1.	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>Sinapis alba</i>	64
5.6.2.	Daphtoxkit F TM	64
5.6.3.	Akutní test toxicity na žábřonožkách <i>Artemia salina</i>	65
5.6.4.	Thamnotoxkit F TM	66
6.	DISKUZE VÝSLEDKŮ	68
7.	ZÁVĚR	72
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	73
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	78
10.	PŘÍLOHY	79

1. ÚVOD

Celá řada xenobiotik se může rozmanitými způsoby dostávat do životního prostředí, kde poté mohou negativně ovlivňovat přírodní ekosystémy. Mezi nezanedbatelnou skupinu xenobiotik pronikajících do životního prostředí patří bezesporu i léčiva.

Na dnešním trhu se objevuje stále více farmak, roste jejich výroba a spotřeba. Tím pádem narůstá množství reziduí léčiv v životním prostředí. Tomu odpovídá i skutečnost, že v odpadních, povrchových a podzemních vodách můžeme detekovat stále vyšší koncentrace jednotlivých druhů farmak. Ve vodním prostředí se tyto látky vyskytují především z důvodu nedostatečného odstranění v procesu čištění na čistíčkách odpadních vod.

Léčiva jsou skupinou kontaminantů, jejichž výskytu se v procesu čištění odpadních vod a osudu v životním prostředí věnuje stále větší pozornost. Děje se tak na základě přibývajících důkazů o tom, že některé z těchto látek jsou perzistentní v životním prostředí. Dále mohou ovlivňovat funkce živých systémů a vyvolat nespočet možných biochemických a fyziologických změn. Představují tak zdravotní rizika a nebezpečí jak pro lidi, tak pro terestriální a akvatický ekosystém. To vše nasvědčuje tomu, že rezidua léčiv představují jasná rizika a nebezpečí pro přírodní ekosystémy a životní prostředí.

Léčiva můžeme detekovat v povrchových a podzemních vodách. V pitných vodách se vyskytují pouze v ojedinělých případech. Ačkoliv jsou jejich koncentrace poměrně nízké, které nemohou vyvolat akutní toxicitu, představuje trvalé a kontinuální vypouštění i takto nízkých koncentrací léčiv do životního prostředí vysoké riziko nebezpečí chronické toxicity. Uvědomování si těchto skutečností, stejně tak jako přítomnost reziduí léčiv v životním prostředí nutí současnou společnost jednat. A to snižováním vypouštění léčiv a prováděním farmakokinetických, farmakodynamických a ekotoxikologických testů léčiv.

Právě prostřednictvím ekotoxikologických testů můžeme hodnotit případný negativní dopad farmak na ekosystém. Jejich provádění je důležité nejen z hlediska možnosti posouzení rizik testovaných látek (léčiv) na zdraví člověka, ale zejména na životní prostředí. Ekotoxikologické biotesty tak nabývají na významu a to nejen v oblasti testování léčiv. Stále se tak vyvíjejí a vylepšují metody, které umožňují sledovat nepříznivý vliv chemických látek na živé organismy a jejich společenstva za standardních, přesně definovaných a reprodukovatelných podmínek.

2. CÍL PRÁCE

Residua léčiv, vyskytující se v odpadních a následně i v povrchových vodách, mohou negativně ovlivňovat akvatický ekosystém. Cílem diplomové práce je posoudit účinky reziduí léčiv na tyto ekosystémy. Za tímto účelem budou prováděny testy ekotoxicity, pomocí kterých budou stanoveny hodnoty LC50 a EC50, popřípadě IC50 na vybraných testovacích organismech, které umožní posouzení případné ekotoxicity testovaných farmak. Testovanými léčivy budou diklofenak a ibuprofen, které patří do skupiny nesteroidních protizánětlivých látek, dále penicilin G a ampicilin ze skupiny antibiotik. Pro dosažení cíle bude provedeno:

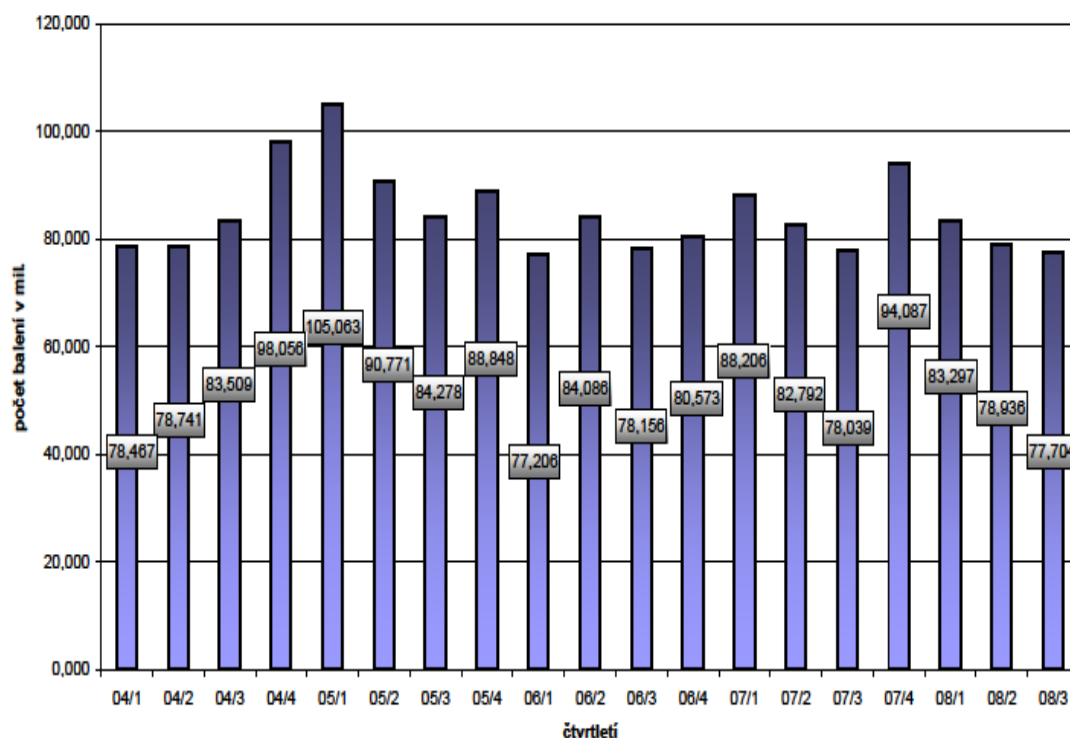
- ekotoxikologické hodnocení vybraných léčiv pomocí alternativních testů ekotoxicity;
- ekotoxikologické hodnocení vybraných léčiv pomocí standardních testů ekotoxicity;
- stanovení hodnot LC50, EC50 a IC50 pomocí těchto testů ekotoxicity;
- zhodnocení získaných výsledků.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Současný stav řešení problematiky

Na dnešním trhu se objevuje celá řada nových léčiv, neustále roste jejich výroba a spotřeba a tím pádem se také stále více léčiv a jejich reziduí dostává do životního prostředí. Skupiny léčiv jako například antibiotika, protizánětlivé látky, antiepileptika, sympatometika, tukové regulátory atd. můžeme detekovat jak v odpadních vodách, v kalech, v chlévském hnoji, tak i v povrchových a podzemních vodách.

Rozšíření těchto látek ve vodním prostředí je dáno především jejich velkou spotřebou a nedostatečným odstraněním v procesu čištění odpadních vod na ČOV. Bohužel informace o koncentracích a rozličných zatíženích v odpadních vodách a vodních tocích a o osudu těchto látek po vypuštění z ČOV jsou nedostatečné. Obrázek 1 udává množství léčivých přípravků distribuovaných v ČR. [1, 2, 3, 4, 5]



Obrázek 1: Celkový objem balení léčivých přípravků distribuovaných do lékáren a dalších zdravotnických zařízení v ČR v období 1. čtvrtletí 2004 až 3. čtvrtletí 2008 [6]

Léčiva jsou vědomě a cíleně vytvářena tak, aby ovlivňovala biochemické a fyziologické funkce živých systémů. Mohou nám sloužit a pomáhat, ale mají však i své stinné stránky. Dostanou-li se do životního prostředí, mohou vyvolat biochemické a fyziologické změny v půdním a vodním prostředí.

Bylo potvrzeno, že biologicky aktivní léčiva v životním prostředí představují jasná zdravotní rizika a nebezpečí jak pro lidi, tak pro terestriální a akvatický ekosystém. Objevuje se totiž stále větší množství přibývajících důkazů o tom, že některé z těchto látek jsou perzistentní v životním prostředí, a že ovlivňují mnoha způsoby necílové organismy. Těmito ovlivněními mohou být například změny v početním poměru narozených samců a samic, feminizace samců, změny v biochemických cyklech, způsobujících nevyhlídnutí larev, různé

stupně anatomických deformací v širokém rozsahu, pozměnění růstu rostlin atd. Skutečnost, že rozmanité druhy organismů mohou být ovlivněny tolika odlišnými způsoby, nasvědčuje tomu, že rezidua léčiv v ekosystémech mohou být daleko větším problémem, než si vůbec uvědomujeme. Navíc vzhledem k faktu, že farmaka jsou záměrně vyráběna k užívání a vytváření efektů u lidí, savců nebo jiných obratlovců, se předpokládá, že rezidua léčiv mohou mít stejný nebo i dokonce větší vliv na lidské zdraví než pesticidy, které jsou vytvářeny k působení proti plevelům, houbám, plísním nebo hmyzu. Léčiva se tak stávají významnou skupinou polutantu v životním prostředí. [7, 8, 9, 10, 11, 12]

V dnešní době, kdy si lidstvo uvědomuje tyto skutečnosti, by mělo být ekotoxikologické testování nutností. V České republice je před dodáním na trh nutná klasifikace chemických látek a přípravků, tak jak udává zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů. Klasifikací se zde rozumí zhodnocení, zda látka nebo přípravek mají jednu nebo více nebezpečných vlastností a jejich zařazení do jednotlivých skupin nebezpečnosti. Zákon č. 356/2003 Sb. se však na léčiva nevztahuje. Nutnost toxikologického testování a zkoumání léčiv se může zdát „brzdou“ vývoje. To je však pouze krátkozraký úsudek. Přínos je neocenitelný nejen pro životní prostředí, zdraví přírody, včetně lidí, ale i pro poznávání pochodů v organismech i celých jejich společenstvech. [13, 14]

3.2. Léčiva

Používání různých látek k léčebným účelům je staré jako lidstvo samo. V průběhu historie prodělal způsob získávání a aplikace léčiv pozoruhodný vývoj. Na jeho počátku byla léčiva připravována výhradně z přírodních zdrojů, vzniklá na základě zkušeností lidového léčitelství. Na jeho konci jsou průmyslově vyráběná chemoterapeutika definovaného složení a účinku. Moderní chemoterapeutika jsou výsledkem racionálního výběru prováděného v rámci cíleného farmaceutického výzkumu. [15]

Jako léčivo neboli farmakum můžeme označit jakoukoli substanci, která svými fyzikálními nebo chemickými účinky vyvolává příznivé změny biologických funkcí organismu. [16]

Pojem léčivo definuje také velmi podrobně Zákon o léčivech č. 378/2007 Sb.: Léčivým přípravkem se rozumí

- látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo
- látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy. [17]

3.2.1. Nesteroidní protizánětlivé látky (NSPZL)

Zánět je komplexní odpověď organismu na lokální poškození fyzikálního, chemického, infekčního, imunologického anebo nutričního původu. Průběh zánětu může být akutní, subakutní nebo chronický. Cílem protizánětlivé léčby je potlačit nepřiměřenou, neúčelnou reakci organismu na zánětlivý podnět, zabránit rozvoji zánětlivých změn bez ovlivnění nebo s minimálním ovlivněním fyziologických funkcí.

Jednou ze skupin látek s protizánětlivým účinkem jsou nesteroidní protizánětlivé látky, neboli nesteroidní antiflogistika. V současné době jsou nejčastěji užívanými farmaky k tlumení mírných a středně silných bolestí, ke snížení zánětlivých reakcí a jako antipyretika. Jde o symptomatická léčiva potlačující bolest především periferním mechanismem a částečně i ovlivněním vnímání bolesti v CNS. Nepůsobí na viscerální bolesti. Intenzita analgetického účinku je nižší než u centrálně působících opioidních analgetik, na druhé straně však při chronické aplikaci nehrozí ani drogová závislost, jakou vyvolává zneužívání opiátů. Většina těchto látek působí antipyreticky.

Další základní vlastností všech nesteroidních protizánětlivých látek je protizánětlivé působení. Výrazně zasahují do akutní fáze zánětu, ale nedokáží zastavit progresi chronických zánětlivých procesů. Analgetický a protizánětlivý účinek NSPZL bývá široce využíván u různých typů onemocnění pohybového aparátu, u zánětlivých a metabolických revmatických onemocnění i degenerativních kloubních onemocnění. [12, 16, 18]

Historie NSPZL

Již v druhé polovině 18. století byla známá schopnost vrbové kůry (*Cortex salicin*) snižovat horečku. Avšak teprve z ní izolovaný antipyreticky účinný glykosid dal počátkem 19. století reálný směr výzkumu, který vyvrcholil přípravou kyseliny acetylsalicylové, účinné látky obsažené téměř ve všech analgetikách. Dalším důležitým objevem bylo poznání antipyretických vlastností kůry chinovníku (*Cortex Chinae*), z níž byl počátkem 19. století izolovaný chinin, který se jako antipyretikum udržel v terapii dodnes. [19]

Hlavní érou rozvoje NSPZL byla však až druhá polovina 20. století. V roce 1952 bylo objeveno antiflogistikum fenylobutazon, který byl však pro časté a závažné vedlejší nežádoucí účinky postupně vytlačen novějšími, výhodnějšími látkami. V roce 1969 se začal vyrábět ibuprofen, který je v současné době v řadě zemí nejčastěji předepisovaným antiflogistikem. V sedmdesátých letech byl do praxe uveden diklofenak, další dodnes velmi oblíbené antiflogistikum, a první antirevmatikum se středně dlouhým biologickým poločasem eliminace naproxen. Devadesátá léta přinesla zcela novou generaci NSPZL tzv. selektivní inhibitory cyklooxygenázy II, vyznačující se prakticky absencí nežádoucích gastrointestinálních účinků. [20]

Mechanismus účinku NSPZL

Přestože mechanismus účinku nesteroidních protizánětlivých látek je zřejmě multifaktoriální, za primární se považuje jejich schopnost inhibovat cyklooxygenázu. Z toho plyne zařazení NSPZL jako inhibitorů cyklooxygenázy. Cyklooxygenáza je klíčový enzym limitující rychlost syntézy prostanoidů, které se účastní řady fyziologických procesů a za patologických situací se významně podílejí na rozvoji bolesti, horečky a zánětu. [12, 16, 21]

Farmakokinetika NSPZL

K systémovému použití lze nesteroidní protizánětlivé látky podávat orálně, rektálně a parenterálně. Po orálním podání, které je nejčastější způsob aplikace, se většina látek dobře vstřebává z trávicího ústrojí. Potrava může zpomalit rychlost absorpce, ale obvykle neovlivní její rozsah. Vazba na bílkoviny krevní plazmy je vysoká, v mnoha případech dosahuje až 99 %. Po opakovaném podání NSPZL pronikají do synoviální tekutiny a dosahují zde asi 60 % plazmatických koncentrací. Vzestup hladiny v synoviální tekutině je pomalý, ale

i eliminace bývá obtížná. Tím dochází, především u látek s krátkým eliminačním poločasem $t_{1/2}$, k výhodné prolongaci terapeutického účinku.

Téměř všechny NSPZL dobře prostupují hematoencefalickou bariérou a většina i placentární bariérou. V játrech dochází k intenzivní biotransformaci (hydroxylaci, oxidaci, glukoronidaci) převážně za vzniku neaktivních metabolitů. [16]

Rozdělení NSPZL

Ke klasifikaci NSPZL lze zvolit různá kritéria, z nichž každé má své přednosti a nedostatky. Nejčastější je dělení podle chemické struktury, které udává tabulka 1.

Tabulka 1: Rozdělení NSPZL podle chemické struktury [16]

Rozdělení nesteroidních protizánětlivých látek
Deriváty kyseliny salicylové, salicyláty
Deriváty kyseliny octové (Diklofenak)
Deriváty kyseliny propionové (Ibuprofen)
Fenamáty
Oxikamy
Pyrazolony

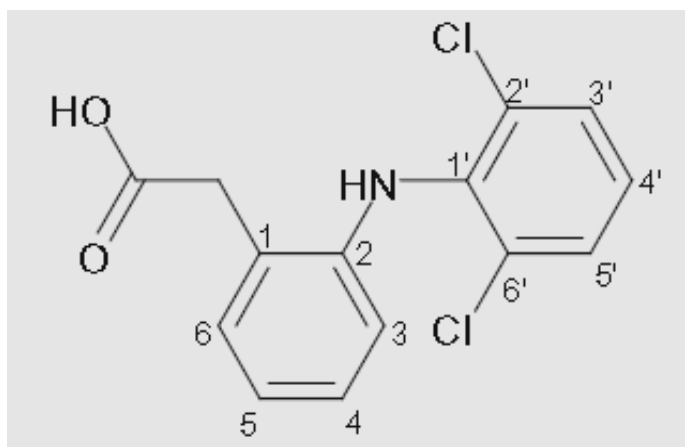
3.2.1.1. Diklofenak

Patří mezi NSPZL do podskupiny derivátu kyseliny octové. Diklofenak je široce užívanou látkou se silnými protizánětlivými a analgetickými účinky a mírným antipyretickým účinkem, dostupnou jako sodná nebo draselná sůl diklofenaku (VOLTAREN, DICLOFENAC, DICLOREUM, MONOFLAM). Je silně účinný a podává se v nízkých dávkách. Po perorálním podání je jeho biologická dostupnost 30 až 70 %. V játrech se metabolizuje na inaktivní metabolity. Má krátký biologický poločas (1 až 2 hodiny), který se prodlužuje v synoviální tekutině až na 6 hodin. Nežádoucí účinky se vyskytují asi u 10 až 20 % léčených a jsou spíše mírné: především gastrointestinální obtíže dále bolesti hlavy, nespavost, podrážděnost, fotosenzitivita.

Pro perorální použití je dostupný jak v retardovaných formách umožňujících podávání jednou denně, tak v lékových formách s rychlým nástupem účinku. Lze tedy volit délku a nástup účinku podle potřeb pacienta. Vyznačuje se velmi dobrou snášenlivostí. Celkové podání je možné doplňovat lokální léčbou prostřednictvím masťí nebo gelů. Lokálně se diklofenak poměrně často používá i v očním lékařství. [12, 16, 15, 21, 22, 23]

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jedná se o bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je slabě hygroskopický, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, hůře už v acetonu a prakticky nerozpustný v etheru. Chemicky se jedná o sodnou sůl kyseliny 2-[(2',6'-dichlorfenyl)amino]fenyloctové. Může být i ve formě draselné soli. Chemickou strukturu diklofenaku zobrazuje obrázek 2 a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti tabulka 2.



Obrázek 2: Strukturní vzorec diklofenaku (DFC) [24]

Denní dávky diklofenaku při terapii se pohybují v rozmezí 75 až 150 mg. Jeho eliminační poločas je dvě hodiny, exkrece žlučí je 65 % z dávky. Při metabolismu dochází k jeho hydroxylaci, což usnadňuje jeho eliminaci močí. Těmito metabolity jsou: 5-OH-DFC; 4'-OH-DFC; 4'-OH-5-Cl-DFC; 3'-OH-DFC; 4',5-diOH-DFC; 3'-OH-4'-CH₃O-DFC. [24, 25]

Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti diklofenaku

Obchodní název	Sumární vzorec	Mr (g/mol)	Rozpustnost ve vodě (25°C)	Teplota tání
Diclofenacum natricum	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	318,13	23,73 mg/l	280 °C

Ekotoxikologické hodnoty

Hodnota EC₅₀ při akutních testech toxicity na organismu *Daphnia magna* se podle studií [24] pohybuje v rozmezí 11,5 mg/l až 22,7 mg/l. Při chronických testech na reprodukci *Daphnia magna* byla hodnota NOEC (koncentrace, při které ještě nebyl vyvolán pozorovatelný efekt) stanovena na 1 až 10 mg/l.

Podle výsledků ekotoxikologických testů odpadních vod prováděných ve čtyřech evropských státech (Francie, Řecko, Itálie a Švédsko) byla stanovena hodnota EC₅₀ diklofenaku na 11,5 mg/l pro 48 hodinový akutní test toxicity na *Daphnia magna*. Pro 48 hodinový test chronické toxicity na organismu *Brachionus calyciflorus* byly stanoveny hodnoty NOEC na 12,5 mg/l a LOEC (nejnižší koncentrace s pozorovatelnými efekty) na 25,0 mg/l. Při testech na *Lemna minor* byla zjištěna hodnota EC₅₀ menší než 10 mg/l.[11]

V případě hodnocení ekotoxicity 81 farmaceutických produktů a běžně používaných výrobků denní potřeby, kde mezi testované látky patřil diklofenak, byla stanovena jeho hodnota EC₅₀ na 22,7 mg/l pro 48 hodinový test na *Ceriodaphnia dubia* a hodnota 11,5 mg/l pro 30 minutový bioluminiscenční test na *Vibrio fischeri*. [1]

Ve studii zabývající se stanovením ekotoxikologického působení farmak na vodní organismy byla mezi 10 vybranými testovanými léčivy sodná sůl diklofenaku. Studie udává hodnotu EC₅₀ na 68,0 mg/l pro 48 hodinový imobilizační test na *Daphnia magna*, hodnotu 72,0 mg/l pro test na organismu *Desmodesmus subspicatus* a hodnotu 7,5 mg/l pro test na okřehekku menším *Lemna minor*. [26]

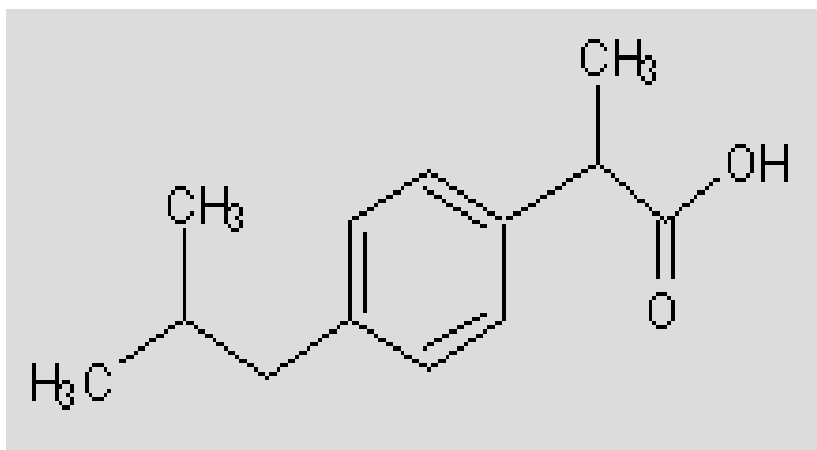
3.2.1.2. Ibuprofen

Patří mezi NSPZL do podskupiny derivátů kyseliny propionové. Pro látky této skupiny je charakteristický dobrý analgetický, antipyretický a protizánětlivý účinek. Ibuprofen (BRUFEN, BRUFALGIT, DOLGIT, NUROFEN) patří mezi neužívanější nesteroidní protizánětlivé látky. Úspěšně rozšířil paletu volně prodejných léků užívaných jako běžná analgetika například při bolesti zubů, hlavy apod. Volně prodejným léčivem se stal díky své nízké toxicitě a minimálním nežádoucím vedlejším účinkům na gastrointestinální trakt. Používá se jednak jako analgetikum nebo jako antiflogistikum při léčení jak akutních, tak chronických revmatických potíží.

Je vhodný ke snížení horečky a tlumení bolestí doprovázející akutní infekční onemocnění u dospělých i u dětí. I když protizánětlivé účinky ibuprofenu jsou spíše mírné a je jich dosaženo po vyšších dávkách (1,6 až 3,2 mg na den rozděleno do čtyř dílčích dávek), než jsou běžné analgetické dávky, je pro svou dobrou toleranci a malé nežádoucí účinky velmi často používán také u revmatoidní artritidy i mimokloubního revmatismu. Pokud jde o účinnost, lze v zásadě podobně hodnotit další deriváty kyseliny propionové ketoprofen, flurbiprofen, farmakokinetikou se však tyto látky liší. [12, 15, 16]

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Ibuprofenum natricum (tab. 3) je bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný v acetonu, v etheru, v methanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitů. Chemicky se jedná o kyselinu (RS)-2-(4-isobutylfenyl)propionovou. Ibuprofen je racemická látka, má pravotočivý optický enantiomer, nazývaný dexibuprofen. Chemická struktura ibuprofenu je znázorněna na obrázku 3. [16, 25]



Obrázek 3: Strukturní vzorec ibuprofenu [27]

Tabulka 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti ibuprofenu

Obchodní název	Sumární vzorec	Mr (g/mol)	Rozpustnost ve vodě (25°C)	Teplota tání
Ibuprofenum natricum	$C_{13}H_{17}NaO_2$	228,29	–	75–78 °C

Ekotoxikologické hodnoty

Ekotoxikologické databáze uvádějí pro 48 hodinový akutní test toxicity na *Daphnia magna* hodnotu LC50 (koncentrace testované látky, která vyvolá úhyn u 50 % testovaných

organismů) ibuprofenu na 9,1 mg/l. Pro 24 hodinový řasový test akutní toxicity byla stanovena hodnota LC50 na 7,1 mg/l a pro 96 hodinový test akutní toxicity na rybách na 173 mg/l. [28]

Ve studii zabývající se stanovením ekotoxikologického působení deseti vybraných farmak na vodní organismy byly stanoveny hodnoty EC50 sodné soli ibuprofenu. Studie udává hodnotu EC50 na 108,0 mg/l pro 48 hodinový imobilizační test na *Daphnia magna*, hodnotu 315,0 mg/l pro test na organismu *Desmodesmus subspicatus* a hodnotu 22,0 mg/l pro test na okřešku menším *Lemna minor*. [26]

Ekotoxikologické testy ibuprofenu byly také provedeny v rámci projektu zabývajícím se osudem 81 farmaceutických produktů a běžně používaných výrobků denní potřeby. Byly stanoveny hodnoty EC50 na 9,1 mg/l pro 48 hodinový test na *Daphnia magna* a hodnota 12,3 mg/l pro 5 minutový test na *Vibrio fischeri*. [1]

3.2.2. Antibakteriální látky (antibiotika)

Antibakteriální látky představují jednu z nejdůležitějších skupin farmak, protože v celé řadě ohledů mají zvláštní postavení ve farmakologii:

- jsou velmi často ordinovány, téměř třetina všech předpisů jsou antibakteriální léky;
- často jsou ordinovány zbytečně, léčba antibiotiky by měla být indikována cíleně, tj. se znalostí původce onemocnění;
- často jsou ordinovány nesprávně, je nutno zohlednit i vlastnosti hostitele, s přihlédnutím k věku, pohlaví, stavu organismu, zejména stavu orgánů ovlivňujících farmakokinetiku antimikrobiálních látek. [16]

Antibiotika (ATB) jsou látky, které byly původně získány jako přírodní produkty mikroorganismů. Nyní jsou většinou připravovány chemickou syntézou nebo chemickou modifikací původních antibiotik. Uměle syntetizované antibakteriální látky označujeme jako chemoterapeutika, pokud to však jsou (alespoň primárně) produkty metabolismu mikroorganismů nazývají se antibiotika. Tato diferenciací pojmů se však v běžné praxi nedodrhuje důsledně.

Antibiotika jsou léky, které buď bakterie zcela ničí (bakteriocidní ATB) nebo alespoň zpomalují jejich růst (bakteriostatická ATB). V takovém případě se předpokládá, že zbývající práci spojenou s ničením bakterií odvede imunitní systém. Jsou používány k léčbě nebo prevenci různých infekčních onemocnění. Ideální protiinfekční látka by měla mít vysoce selektivní účinky na infekční agens a minimálně by měla ovlivňovat makroorganismus.

V lidském těle se za normálního stavu skrývají miliardy bakterií. Odhaduje se, že jejich počet je vyšší než počet buněk v lidském organismu. Ideální antibiotikum není to, které zabíjí všechny mikroby, ale takové, které cíleně vyhubí nebezpečné bakterie a přitom co nejméně ovlivní přirozené bakteriální osídlení.

Každá skupina ATB účinkuje na jiné spektrum patogenů. Žádná z běžných antibiotik nejsou účinná u virových nebo plísňových infekcí. Hlavní indikační oblastí ATB jsou infekční onemocnění bakteriálního a fugálního původu. Často se však také podávají jako prevence proti druhotné nákaze např. v případech těžších viróz. Antibakteriální látky nejsou efektivní u virových, plísňových a jiných nebakteriálních infekcí. [12, 15, 18, 29, 30]

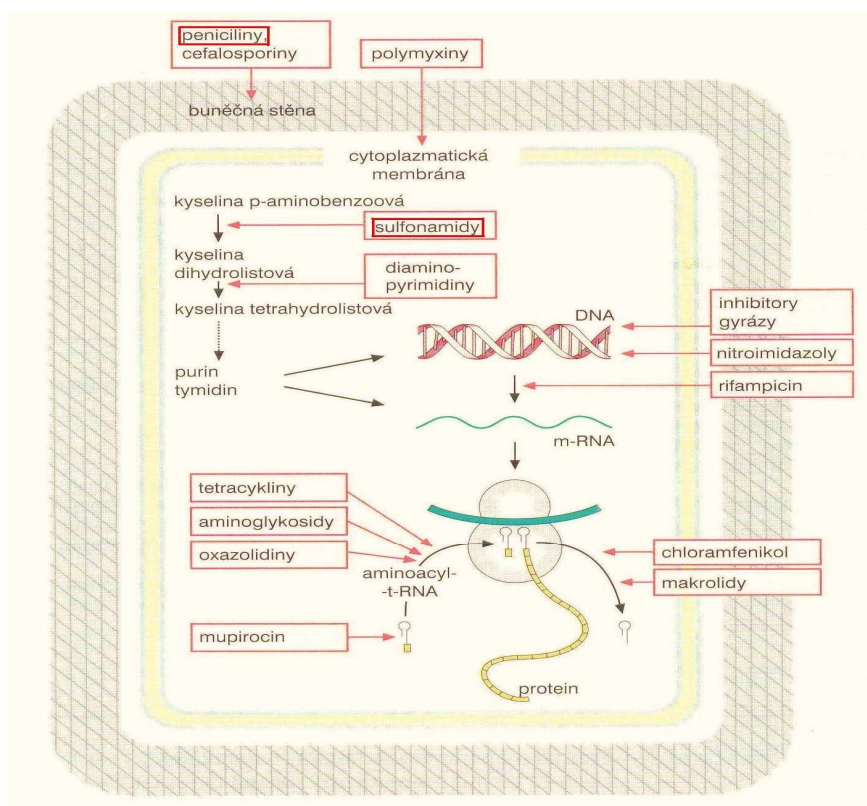
Historie antibiotik

Objevování antibiotik probíhalo v několika časových etapách. Jejich historie sahá až do devatenáctého století, kdy roku 1877 L. Pasteur popsal antagonistické působení některých anaerobních bakterií na růst bacilu *Bacillus anthracis* a poukázal na možnost využití tohoto poznatku v medicíně. Účinek antibiotik popsali v roce 1898 i čeští badatelé – mikrobiolog Honl a dermatolog Bukovský. V roce 1928 Alexandr Fleming objevuje penicilin, za jehož objev později dostává Nobelovu cenu. Avšak teprve práce Howarda Floreyho a Ernsta Chaina, které začaly v roce 1940 a ověřovaly Flemingovy nálezy, znamenají možnost získávání penicilinu v dostatečném množství. Antibiotika se začínají vyrábět ve velkém a otvírá se tak nová terapeutická éra těchto látek. [15, 31]

Mechanismus účinku antibiotik

Mechanismus účinku charakterizuje způsob zásahu antibiotika do syntézy makromolekul bakteriální buňky. Místa působení v buňce znázorňuje obrázek 4. Přes značný počet účinných látek lze však počet míst zásahu, a tím i způsobů účinku antibiotik, rozdělit jen do několika málo skupin:

- inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny
- porušení buněčné cytoplazmatické membrány
- inhibice syntézy bílkovin
- inhibice syntézy nukleových kyselin
- inhibice metabolismu bakteriální buňky.



Obrázek 4: Místa působení antibiotik v buňce [12]

Rozdělení penicilinů

Peniciliny jsou jednou ze skupin antibiotik. Spolu s cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy tvoří skupinu β -laktamových antibiotik. Výchozí strukturou penicilinů je kyselina 6-aminopenicilanová. K této kyselině jsou u přirozených i polysyntetických penicilinů připojeny různé postranní řetězce a skupiny, které mají vliv na vlastnosti a účinky jednotlivých penicilinových antibiotik. Rozdělení penicilinů udává tabulka 4. [16, 30]

Tabulka 4: Rozdělení penicilinů [16]

Rozdělení penicilinů podle struktury
Základní peniciliny (penicilin G)
Peniciliny stabilní vůči stafylokokové penicilináze
Aminopeniciliny (ampicilin)
Karboxypeniciliny
Acelureidopeniciliny

3.2.2.1. Ampicilin

Ampicilin (BINOTAL, AMPICILIN) zařazujeme do skupiny aminopenicilinů. Peniciliny jsou více než 50 let nejčastěji užívanou skupinou antibiotik. Nové deriváty těchto látek mají nejen výhodné farmakokinetické účinky, ale mají také rozšířené spektrum účinku. Významnou předností penicilinů je jejich baktericidní působení a malá obecná toxicita. Všechny peniciliny mají rychle nastupující bakteriocidní účinek.

Mechanismus jejich účinku zahrnuje řadu kroků vedoucích k inhibici syntézy buněčné stěny. Jde o vazbu na enzymy PBP (penicilin-binding proteins). Působí na většinu grampozitivních a gramnegativních mikrobů, jsou však hydrolyzovány beta-laktamázi stafylokoků a některých gramnegativních mikroorganismů.

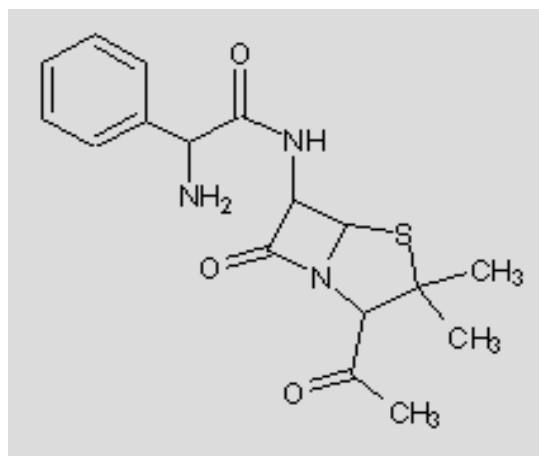
Peniciliny mají výborný bezpečnostní profil. Jsou velmi málo toxické, jedinou klinicky podstatnou nevýhodou je riziko reakce z přecitlivělosti. Z nežádoucích účinků jsou relativně časté reakce z přecitlivělosti, především ve formě dermatologických projevů, nejčastěji kopřivka. Jinak se mohou vyskytnout nauzea, zvracení a průjemy.

Farmakokinetika je charakterizována poměrně dobrým průnikem do biologických tekutin, malým průnikem do buněk a převažujícím vylučováním ledvinami. Biologický poločas je krátký, kolem 1 hodiny. Farmakodynamicky patří mezi antibiotika s účinkem nezávislým na koncentraci, cílem dávkování je dostatečně dlouhé udržování účinných koncentrací nad minimálními inhibičními koncentracemi.

Po perorálním podání ampicilinu se vstřebává asi 30 % podané dávky, absorpce je kvantitativně snižována potravou, a proto je perorální léková forma ampicilinu opouštěna ve prospěch amoxicilinu. Amoxicilin dostáváme zavedením hydroxylové skupiny do para pozice na fenylové jádro ampicilinu, čímž dosáhneme zlepšené účinnosti pro perorální podání. Většinou se ampicilin podává 3 krát denně (0,5 až 1,0 g). Nitrosvalově se podává v dávkovacím intervalu po 6 hodinách. [12, 15, 16, 30, 32]

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jedná se o bílý krystalický hyroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu, v lihu, v etheru a v mastných olejích. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů. Chemicky se jedná o sodnou sůl kyseliny (6R)-6-[2-amino-2-fenylacetamido)penicilanové (obrázek 5). Fyzikálně chemické vlastnosti znázorňuje tabulka 5. [25]



Obrázek 5: Strukturní vzorec ampicilinu [12]

Tabulka 5: Fyzikálně-chemické vlastnosti ampicilinu.

Obchodní název	Sumární vzorec	Mr (g/mol)	Rozpustnost ve vodě (25°C)	Teplota tání
Ampicilinum natricum	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	371,39	1,39 mg/ml	–

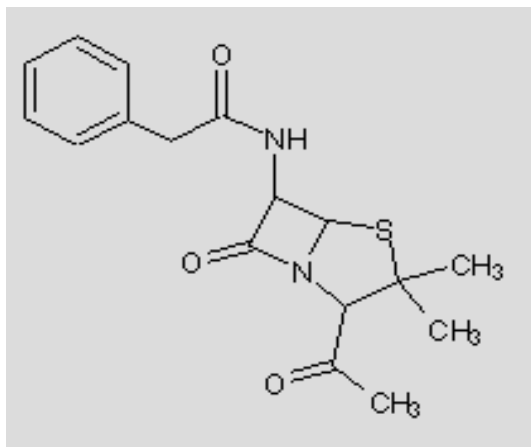
3.2.2.2. Penicilin G (benzylpenicilin)

Penicilin G neboli benzylpenicilin patří do podskupiny základních penicilinů. Penicilin G je stále důležitým penicilinem pro parenterální podání, je dobře účinný vůči grampozitivním bakteriím (především strepto-kokům) a gramnegativním bakteriím (meningokoky, gonokoky). Mechanismus účinku je identický jako u ampicilinu. Všem penicilinům je společné také jejich baktericidní působení, rozšířené protiinfekční spektrum, malá obecná toxicita.

Penicilin G se vylučuje ledvinami glomerulární filtrací a z největší části (z 90 %) tubulární sekrecí. Frakce vyloučená do moči za 24 hodin představuje 79 až 85 % podaného léčiva. Hladina penicilinu G velmi rychle klesá, jeho biologický poločas je asi 30 minut. V klinické praxi se používá několik forem přirozených penicilinů. Benzylpenicilin, sodná nebo draselná sůl, se podává ve formě dlouhotrvajících nitrožilních infúzí u infekcí vyvolaných citlivými mikroby. Je stále lékem první volby u meningokokové meningitidy, pneumokokové pneumonie, stejně jako závažných infekcí vyvolaných kmeny *Streptococcus pyogenes*, klostridiemi nebo aktinomycetami. V praxi se také používají depotní přípravky penicilinu G, které uvolňují účinnou látku pomaleji a udržují tak dostatečně vysokou hladinu v séru po delší dobu. Přípravky těchto vlastností jsou ve vodě špatně rozpustné soli penicilinového aniontu s organickým kationtem: procainpenicilin G a benzathinpenicilin G. [12, 16, 30, 32]

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, nerozpustný v olejích a parafinu. Chemicky se jedná o kalium-(2S,5R,6R)-6-(fenylacetamido)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo [3.2.0] heptan-2-karboxylát. Chemickou strukturu penicilinu G zobrazuje obrázek 10, fyzikálně-chemické vlastnosti tabulka 6. [25, 33]



Obrázek 6: Strukturní vzorec penicilinu G [33]

Tabulka 6: Fyzikálně-chemické vlastnosti penicilinu G.

Obchodní název	Sumární vzorec	Mr (g/mol)	Rozpustnost ve vodě (25°C)	Teplota tání
Benzylpenicillinum kalicum	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ KS	372,48	–	–

Ekotoxikologické hodnoty některých antibiotik

V rámci projektu [34] zabývajícím se posouzením možných efektů antibiotik na mořské a brakické systémy byly provedeny ekotoxikologické testy na naupliích *Artemie*. Testovanými antibiotiky byli aminosidin, bacitracin, flumequin, lincomycin a erythromycin. Příslušné hodnoty EC50 udává tabulka 7.

Tabulka 7: Hodnoty EC50

	24hEC50	48hEC50	72hEC50
Aminosidin	–	2220 mg/l	846,5 mg/l
Bacitracin	34,1 mg/l	21,8 mg/l	–
Flumequin	476,8 mg/l	307,7 mg/l	96,4 mg/l
Erythromycin	–	–	283,1 mg/l

Stanovením akutní a chronické toxicity na korýši *Daphnia magna* se zabývala studie devíti antibiotik, používaných jako terapeutika nebo růstové regulátory. Oxolinová kyselina, metronidazol, olaquinox, oxytetracyklin, streptomycin, sulfadiazin, tetracyklin, tiamulin a tylosin byly testovány v souladu se standardními postupy OECD (Organization for Economic Cooperation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) a ISO (International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro standardizaci). Stanovené hodnoty EC50 pro některá výše zmíněná antibiotika jsou uvedeny v tabulce 8. [35]

Tabulka 8: Hodnoty EC50

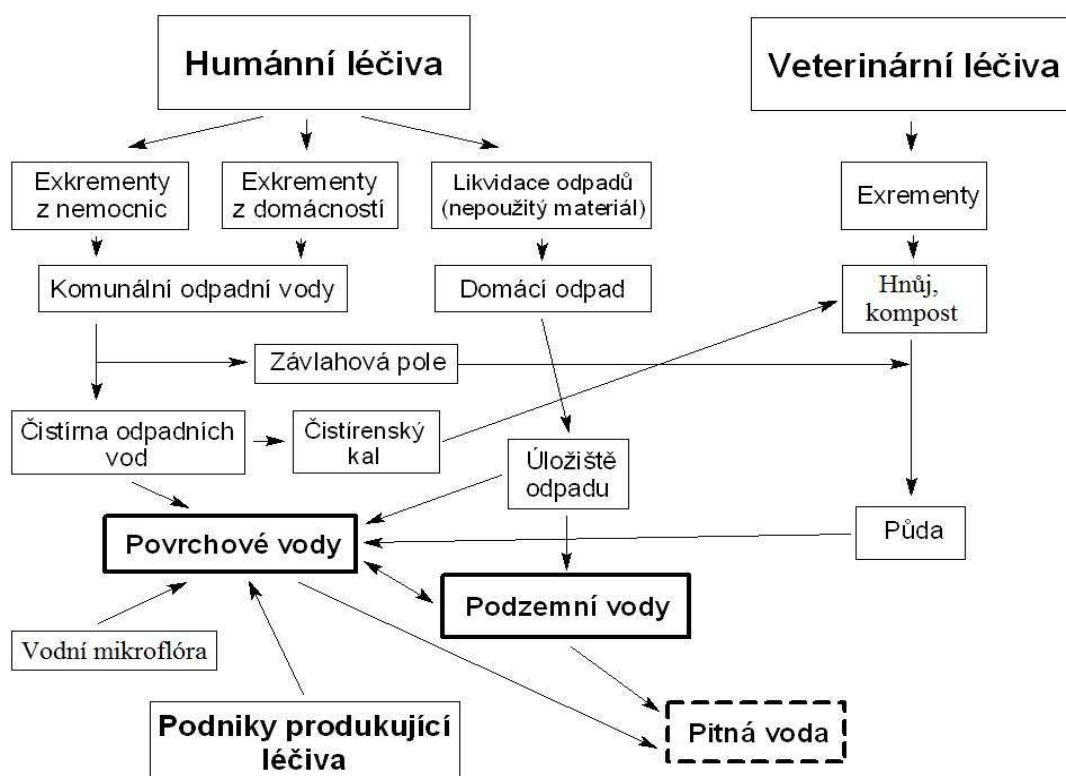
	24hEC50	48hEC50
Oxolinová kyselina	5,9 mg/l	4,6 mg/l
Streptomycin	947,0 mg/l	487,0 mg/l
Sulfadiazin	–	221 mg/l
Tiamulin	81,0 mg/l	40,0 mg/l
Tylosin	–	680,0 mg/l

3.3. Osud a zdroje průniků reziduí léčiv do životního prostředí

K predikci možných účinků chemických látek na vodní ekosystémy je dobré znát nebo předpovídat osud těchto látek v životním prostředí, tím se myslí jejich transport, perzistence, distribuce nebo rozdělování mezi jednotlivé složky životního prostředí. Důležité je i stanovení jejich biologické dostupnosti a bioakumulace. Komplexní stanovení osudu chemických látek ve vodním prostředí popisují matematické a fyzikální modely. [36]

Možné zdroje či průniky reziduí léčiv a jejich následný osud v životním prostředí znázorňuje obrázek 7. Rezidua léčiv se mohou do životního prostředí dostávat těmito základními způsoby:

- humánní a veterinární aplikace;
- jejich neodstraněním na čističkách odpadních vod (ČOV);
- přímou aplikací do prostředí;
- únikem z výroby léčiv.



Obrázek 7: Schéma možných zdrojů a cest průniků reziduí léčiv do akvatického prostředí [37]

3.3.1. Humánní a veterinární aplikace

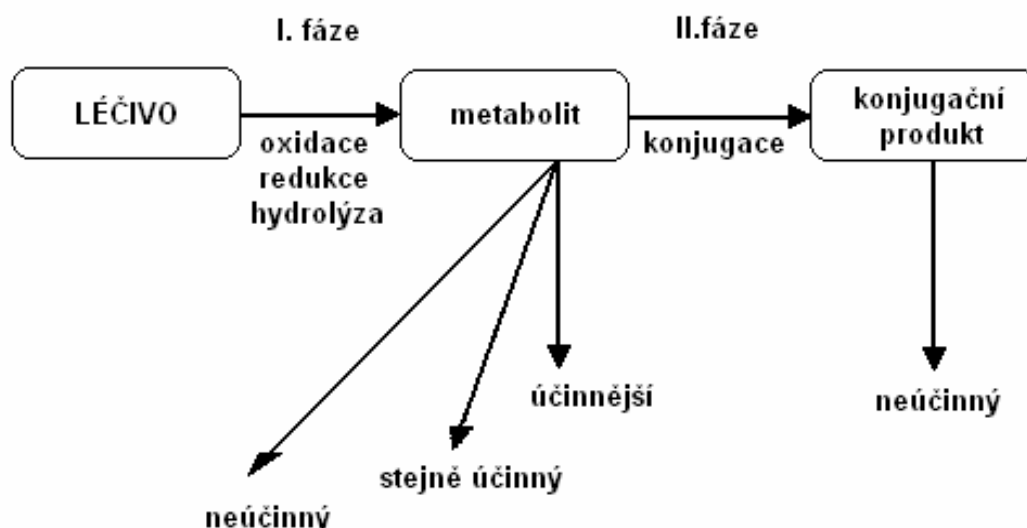
Podstatný zdroj léčiv v životním prostředí představují humánní a veterinární aplikace. Látky jako tukové regulátory, růstové regulátory, nesteroidní protizánětlivé látky, antibiotika, antiepileptika atd. jsou stále častěji využívány a aplikovány jak v humánní tak veterinární medicíně. Produkty metabolismu a vylučování těchto látek živými organismy jsou závažnou příčinou průniku léčiv do životního prostředí. Může se jednat o přímý průnik do životního prostředí, nebo v případě jejich svedení kanalizací o průnik až po procesu čištění odpadních vod na ČOV. Tyto vstupy reziduí léčiv do životního prostředí umocňuje jejich zneužívání, nadbytečné používání, nebo vyhazování a splachování nepoužitých léčiv. [1, 7, 38, 39]

Má-li určitá látka, nebo léčivo podané v rámci humánní či veterinární medicíny působit, musí se nejdříve resorbovat v organismu a distribuovat do patřičné cílové tkáně. Přitom dochází k její metabolické přeměně a nakonec k vyloučení z organismu. Množství léčiv, které se vyloučí v nezměněné podobě, závisí na procesu eliminace těchto látek v organismech. Jako eliminaci látek z organismu označujeme pochody, které vedou k odstranění účinných látek ze systémové cirkulace. Na tomto pochodu se podílejí exkrece, která může probíhat v ledvinách, ve střevě, ale také plícemi nebo kůží, a biotransformace, která představuje metabolickou přeměnu podané látky. [12, 18, 40]

Biotransformace

Existence velkého množství různých chemických sloučenin, které jako farmaka přivádíme do organismu, podmiňuje rozmanitost jejich biotransformace. V procesu metabolizace mohou tyto látky svoji účinnost ztrácet nebo naopak se z nich mohou stávat látky reaktivnější. Biotransformační procesy mohou být ovlivněny řadou faktorů, například reversibilní vazbou léčiv na plasmatické proteiny nebo depotní vazbou léčiv ve tkáních. Dalšími faktory ovlivňujícími biotransformaci jsou věk a pohlaví, genetické predispozice, patologický stav nebo interakce mezi léčivy. Biotransformace zahrnuje hydrolýzu, oxidaci, redukci, alkylaci, dealkylaci a konjugaci s kyselinou glukuronovou, sírovou apod. Přehled biotransformačních reakcí a fází znázorňuje obrázek 8. Obecně lze biotransformační reakce rozdělit na dvě fáze: [12, 41, 42]

- **I. fáze** – Reakcemi I. fáze se mění struktura léčiva, tvoří se reaktivnější a ve vodě více rozpustné metabolity. Mezi tyto reakce patří oxidace, redukce, hydrolýza probíhající na reakčních $-OH$, $-NH_2$, $-SH$ a $-COOH$ skupinách. Produkty těchto reakcí tak lépe podléhají dalším biotransformačním reakcím v II. fázi nebo přímo eliminaci.
- **II. fáze** – V II. fázi biotransformace probíhají konjugační reakce s výchozí látkou nebo jejími metabolity z I. fáze, například vazba na kyselinu glukuronovou, kyselinu sírovou, glutamin, cystein nebo na glycin. Produkty těchto reakcí jsou polárnější, více rozpustné ve vodě a ochotněji podléhají eliminaci. Jednou z nejčastějších konjugačních reakcí je glukuronidace, která konvertuje exogenní i endogenní látky na glukuronoidy. Glukuronoidy jsou látky polární a rozpustné ve vodě a jsou extrahovány jak močí, tak žlučí podle velikosti molekuly.



Obrázek 8: Přehled biotransformačních fází ve vztahu k možným farmakodynamickým účinkům vzniklých metabolitů [43]

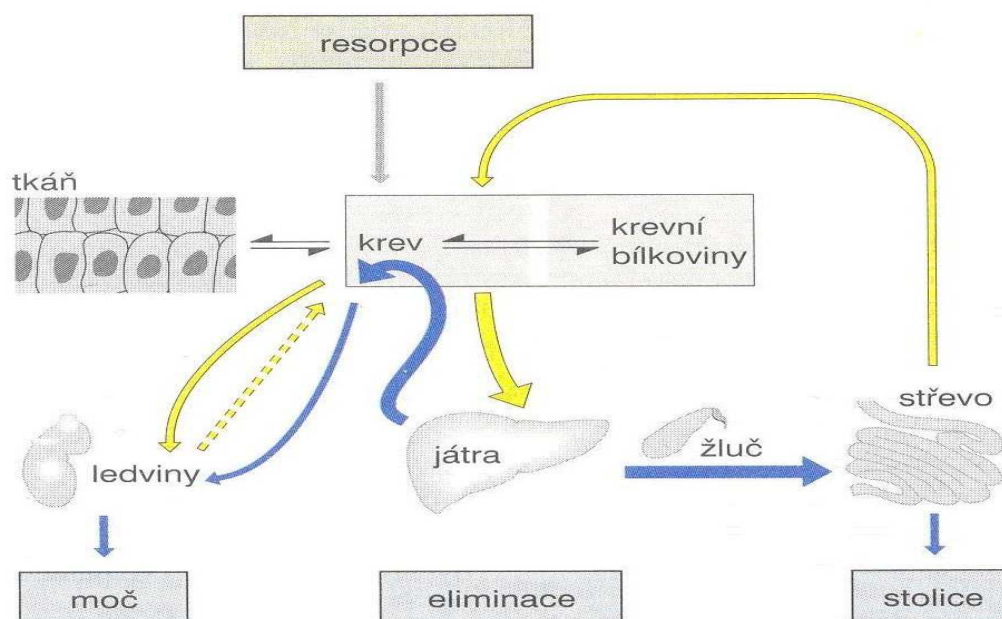
Produkty biotransformačních reakcí nemusí být vždy méně toxické, v některých případech mohou být více toxické nebo reaktivnější než výchozí sloučenina. V tomto případě mluvíme o bioaktivaci. [12, 40, 41, 44]

Vylučování léčiv

Léčiva se mohou vylučovat různými cestami. Průběh těchto procesů vylučování závisí jak na stavu a vlastnostech odstraňovaných látek, tak na stavu a vlastnostech organismů. Vylučování farmak z organismu se odehrává především prostřednictvím ledvinové a fekální exkrece. Takto se v moči a stolici objevuje největší množství původně podané látky nebo jejich metabolitů.

Nejdůležitější součástí fekální exkrece je žlučová exkrece. Toxické látky přicházejí z gastrointestinálního traktu krví nejdříve do jater, které mají schopnost zabránit jejich distribuci do ostatních tkání. V játrech se uskutečňuje většina biotransformačních procesů, z nich se farmaka nebo jejich metabolity mohou odevzdávat opět do krve, anebo být vyloučeny přímo do žluče a prostřednictvím ní exkretovány ve faeces. Podle fyzikálně-chemických vlastností mohou být některé látky zpětně reabsorbovány v enterohepatálním oběhu. Proces distribuce a eliminace léčiv popisuje obrázek 9. Vylučování potem, slinami nebo mlékem nemá z kvantitativního hlediska poklesu množství látky v organismu význam. Eliminace plícemi je rozhodující pouze pro některé látky, jako například celková anestetika.

Jestliže se látka dostala do krve, rozdělí se mezi krev a tkáň. Rozhodující význam pro toto rozdělení mají rozpustnost, velikost molekul a elektrický náboj látky. Do primární moči se látky dostávají glomerulární filtrací a tubulární sekrecí. Farmaka rozpustná v tucích se většinou zpětně resorbují v tubulech, a proto se ledvinami nevylučují buď vůbec, anebo se vylučují jen špatně. Nejdůležitějšími faktory ovlivňující vylučování ledvinami jsou především stav funkce ledvin a cirkulace, acidobazické poměry a kompetice o transportní mechanismy s dalšími současně přítomnými látkami. [7, 12, 39, 40, 41]



Obrázek 9: Distribuce a eliminace farmak [12]

Některá farmaka se v eliminačních orgánech mohou koncentrovat a mohou tak lokálně dosáhnout toxických koncentrací (tzv. kumulace). Pod pojmem kumulace rozumíme pozvolné zvyšování koncentrace farmaka v plazmě a tkáních při podávání látky v pravidelných časových odstupech. Kumulace vzniká vždy, jestliže se za jednotku času přivádí do organismu více určité látky, než kolik se může za tutéž časovou jednotku eliminovat. Proto se může kumulovat každá látka, jestliže jednotlivé dávky následují dostatečně rychle po sobě. Kumulace může vést k podstatnému zesílení účinků nejen terapeutických, ale také nežádoucích. Tomu se dá předcházet správnou volbou dávky a intervalu podáváníí. [12, 40]

Kinetika eliminace

Výše popsané procesy biotransformace a exkrece se podílejí na aktuální koncentraci toxické látky v plazmě a to v časové závislosti od její expozice. Eliminace z organismu probíhá nejčastěji exponenciálně, tedy kinetikou prvního řádu. Znamená to, že za stejnou dobu se vždy vyloučí stejné procento původního množství noxy. Rychlost eliminace se tak dá dobře charakterizovat konstantou biologického poločasu ($t_{1/2}$), to je dobou, za kterou se vyloučí polovina původně přítomného množství. Za jeden poločas tedy klesne obsah na 1/2, za další na 1/4, dále na 1/8 původního množství. Jedná se o stejnou kinetiku, kterou se řídí rozpad radioaktivních izotopů. V rámci této kinetiky prvního řádu platí, že množství eliminované látky je v daném čase přímo úměrné množství látky v těle, a že biologický poločas $t_{1/2}$ je nezávislý na dávce. [40, 41, 45]

3.3.2. Rezidua léčiv na ČOV

Další podstatný zdroj a možnost vstupu reziduí léčiv do životního prostředí představuje nedokonalé odstranění těchto látek v procesu čištění odpadních vod na ČOV. Do odpadních vod se léčiva dostávají především prostřednictvím vylučování. Právě produkty metabolismu a vylučování těchto látek živými organismy jsou nejzávažnější příčinou průniku léčiv do

životního prostředí. Léčiva se do odpadních vod dostávají jak z humánní tak veterinární medicíny. Zdroje humánních farmak jsou především zdravotnická centra a rezidentní oblasti. Zdroje veterinárních farmak představují zemědělská a chovatelská střediska. Většina odpadních vod z humánní i veterinární medicíny je svedena kanalizací na ČOV, kde v procesu čištění nedochází ke zcela kvantitativnímu odstranění většiny farmaceutických látek.

Efektivní činnost čističek odpadních vod spočívá v minimalizování vypouštění xenobiotik do vodního prostředí, avšak v případě léčiv tomu tak zcela není. Jestliže tyto látky nejsou biodegradovány nebo odstraněny na ČOV, dostávají se do vodního prostředí a mohou tak ovlivňovat povrchové i spodní vody. Obzvlášť některé malé vodní toky, které většinu své vody přijímají z ČOV, jsou značně kontaminovány. Koncentrace některých farmak zde mohou přesahovat hodnotu 1 µg/l. [1, 12, 46, 47]

Nesteroidní protizánětlivé látky jsou jedna z nejrozšířenějších skupin léčiv vyskytujících se v životním prostředí. Některé studie ukazují, že nedostatečné odstranění na ČOV platí zejména pro tyto látky. Diklofenak a ibuprofen patří k nejčastěji se vyskytujícím léčivům v odpadních vodách. Jejich koncentrace se zde pohybují v rozmezí 0,01 až 510 µg/l pro diklofenak a 0,49 až 990 µg/l pro ibuprofen. Odstranění NSPZL jako jsou ibuprofen a ketoprofen v procesech čištění těchto vod je však pouze z 87 % a v případě diklofenaku pouze 49 až 59 %. Zwiener a Frimmel poukazují však na možnost odstranění diklofenaku z pitných vod použitím ozonizace. Odstranění diklofenaku z městských a průmyslových odpadních vod je možné i za použití membránové filtrace. V případě ibuprofenu jsou jeho koncentrace v povrchových vodách mnohem menší. V lidském těle je metabolizován na karboxy- a hydroxy-ibuprofen, které se také vyskytují v surových odpadních vodách. [4, 37, 47, 48]

Obdobné platí i v případě antibiotik. Můžeme je detekovat v povrchových, podzemních i pitných vodách. Navíc antibiotika mají předpoklady narušovat procesy biologického čištění v ČOV a ovlivňovat mikrobiální složku povrchových vod. Penicilin G se dokonce řadí k nejčastěji se vyskytujícím antibiotikům v odpadních vodách. V případě studií zabývajících se výskytem a osudem antibiotik v odpadních a povrchových vodách prováděných na území Německa, Švýcarska a USA se hodnoty jejich koncentrací pohybovaly v řádech µg/l. Sledovanými skupinami antibiotik byly následující – makrolidy (clarithromycin, erytromycin, roxithromycin), sulfonamidy (sulfomethoxazol, sulfathiazol), fluorochinolony (ciprofloxacin, norfloxacin), dále chloramphenicol a trimethoprim. Při tomto monitorování rozmanitých vzorků povrchových a podzemních vod nebyla detekována přítomnost penicilinů nebo tetracyklinů. Tato skutečnost není až tak překvapující, protože peniciliny jsou velmi lehce hydrolyzovány a tetracykliny se ochotně akumulují v sedimentech nebo splaškových kalech. [1, 37, 46, 48]

3.4. Ekotoxikologie

Termín ekotoxikologie použil jako první okolo roku 1969 člen francouzské akademie věd Dr. Rene Truhaut. Definoval tuto disciplínu jako “studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva”. [49]

Ekotoxikologie je multidisciplinární přírodní vědou, která zahrnuje experimentální a teoretické poznatky vědních oborů jako jsou ekologie, toxikologie, chemie životního prostředí a biologie. Zabývá se studiem toxického působení látek lidského či přírodního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva. Ekotoxikologie tedy zkoumá

účinky toxických látek na všech biologických úrovních živé přírody. Kromě sledování účinků látek je předmětem zájmu ekotoxikologie i jejich pohyb v životním prostředí.

Hlavním cílem oboru je ochrana živé přírody a člověka jako její integrální součásti a vývoj metod, které umožňují sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních reprodukovatelných podmínek. Metody musí umožnit srovnání účinků různých látek mezi sebou a především srovnání odpovídajících výsledků z různých laboratoří. Dalšími úkoly ekotoxikologie je předpovídání a odhadování škodlivosti chemikálií a rizik spojených s jejich životním cyklem, předcházení a zabraňování ohrožení ekosystémů, studium a hodnocení účinků chemických látek. [49, 50]

3.4.1. Experimentální metody hodnocení ekotoxicity

U každého xenobiotika, s kterým přichází do styku člověk nebo vybraní živočichové, a to při zevní nebo vnitřní expozici, je potřebné, vzhledem k použití znát jeho toxicitu. Touto toxicitou se rozumí jak ireverzibilní poškození důležitých fyziologických funkcí, vedoucích ke smrti nebo k trvalým nežádoucím následkům, tak reverzibilní poškození, které odezní za určitou dobu po přerušení expozice toxické látky.

Ke zjišťování toxických účinků jednotlivých xenobiotik byla vypracována řada experimentálních testů, které se provádějí jak *in vitro*, tak *in vivo* na experimentálních organismech. Na vypracování těchto testů se podílí Mezinárodní organizace pro standardizaci ISO (International Organisation for Standardization).

Testy toxicity jsou tedy základním nástrojem ekotoxikologické práce. Slouží k určení druhu a míry nepříznivého působení látek na testovací organismy. Parametry získané z testů toxicity jsou používány pro hodnocení rizik spojených s výskytem testovaných látek v životním prostředí.

Všechny biologické testy se musí provádět podle zásad a směrnic správné laboratorní praxe GLP (Good Laboratory Practice), které určují především jakostní standardy pro plánování, provádění, kontrolu a analýzu klinických studií. Dále všechny biologické testy musí splňovat zásady etické práce s laboratorními zvířaty s ohledem na zákon na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. v platném znění zákona č. 77/2004 Sb. Při testech, kdy se používají laboratorní zvířata, musí být všechny projekty pokusů předem schváleny odbornou komisí pracoviště a následně příslušnou resortní komisí. Pracovníci, kteří řídí pokusy na laboratorních zvířatech, musejí mít osvědčení o odborné způsobilosti, laboratorní technici a ošetřovatelé osvědčení o odborné způsobilosti k péči o zvířata. [12, 40, 41, 51]

3.4.2. Základní rozdělení testů toxicity

3.4.2.1. Podle doby expozice

Podle doby trvání expozice můžeme testy toxicity rozdělit na:

➤ **Akutní testy toxicity** – Stanovení akutní toxicity patří mezi klasické toxikologické zkoušky. Principem je měření efektů toxických látek na testovaných organismech po krátkou dobu jejich života. Délka trvání akutních testů toxicity je v rozmezí 24 až 96 hodin. Jejich prostřednictvím se sledují účinky, které se projeví v krátké době po jednorázovém podání látky. Slouží tak k určení okamžitého účinku látek. Výsledkem ekotoxikologické zkoušky

jsou hodnoty LD50 (dávka testované látky, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů v době testovací studie), LC50, EC50 a IC50 (inhibiční koncentrace testované látky, která vyvolá inhibici u 50 % testovaných organismů). Hodnoty bývají udávány v jednotkách mg/l nebo ml/l. Podle těchto hodnot lze testovanou látku zařadit do tříd toxicity a odhadnout míru jejího škodlivého působení na organismy. Akutní toxicita však udává pouze relativní toxicitu testované látky. [36, 40, 52, 53]

➤ **Subchronické testy toxicity** – Při těchto testech jsou organismy testované opakovaně, obvykle jsou jednou denně exponovány danou látkou nebo kombinací látek. Podávání látky se provádí přibližně po dobu 10 % délky života testovaného organismu. Jestliže je látka podávána po kratší dobu, označuje se test jako subakutní toxicita (nejčastěji se jedná o dobu 14, 21 nebo 28 dní). S kontrolní skupinou musí být zacházeno stejným způsobem jako s exponovanou, kromě podávání zkoumané látky. Tím se separují vlivy prostředí od působení dané látky. Tyto testy slouží k získání hodnot NOEC a LOEC, avšak nemusí odhalit následky dlouhodobého působení. Výsledky subchronických testů jsou také velmi užitečné pro účelné navržení chronického testu, proto se zpravidla provádějí i před testy chronickými. [52, 53, 54, 55]

➤ **Chronické testy** – Z důvodu rostoucího zájmu o sledování a studium pozdních účinků látek je i těmto testům věnována stále větší pozornost. Pro zvolení postupu při chronických testech toxicity jsou důležité výsledky subchronických testů toxicity. Cílem chronických studií je charakterizovat účinky testovaných látek na organismus po jejich dlouhodobém opakovaném podávání. Při těchto testech jsou tedy testované organismy exponovány studované látkou často po celou dobu života nebo jeho podstatnou část. V daných pravidelných intervalech se testovaným organismům podává testovaná látka a v průběhu experimentu jsou sledovány jednotlivé patologické změny pomocí vhodně zvolených parametrů, které indikují škodlivý účinek. Kontrolní skupina musí být stejně početná jako skupiny exponované a musí být držena za stejných podmínek, jen s tím rozdílem, že zůstává neexponována sledované látkou. Tyto testy slouží k získání informací o dlouhodobém působení látky na živý organismus a pro určení hodnot NOEC a LOEC. [36, 40, 52, 53, 54]

3.4.2.2. Podle uspořádání testu

Odborníky jsou rozeznávány tři generace biotestů pro monitoring životního prostředí:

➤ **Testy 1. generace** – Jedná se o tzv. klasické (standardní, konvenční) biotesty. Jsou běžně používané po celém světě. V České republice jsou doporučovány čtyři konvenční testy, metodicky identické s evropskými ISO (International Standardization Organisation) normami:

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity;
- ČSN EN 28692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692; 1989);
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – část 2: Obnovovací metoda;
- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů.

Tyto biotesty mají jednu velkou výhodu v tom, že jsou uznávány mezinárodními legislativami. Na druhé straně jejich provedení je značně náročné. Kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat a navíc živočichové se musí krmit dalšími organismy. Samotné testování zabírá mnoho laboratorního prostoru (akvária, 250 ml Ehrlenmeyrovy baňky), spotřebovává velká množství testovaného materiálu a v neposlední řadě vyžaduje vyšší počet pracovních sil, delší pracovní dobu nejen pro provedení testu, ale i na mytí laboratorního skla a péči o matečné kultury. Z těchto důvodů se následující druhá generace mikrobiotestů jeví jako výhodná alternativa ke konvenčním testům toxicity. [56, 57, 58, 59]

➤ **Testy 2. generace** – Rostoucí potřeba testovat ve velkých sériích nové chemické látky a vzorky z životního prostředí vedla ve vývoji biotestů k následujícím trendům: miniaturizace, zkrácení doby inkubace, zjednodušení a možnost alternací při vyhodnocování testů, zlevnění biotestů, zapojení biotestů reprezentujících různé trofické úrovně v ekosystému, přehodnocování standardních testů, využití nových vědeckých poznatků apod. Proto se v poslední době těší zvýšené pozornosti mikrobiotesty, jejichž hlavním posláním je měřit specifický efekt testovaného kapalného vzorku, kterým byl exponován jednobuněčný nebo malý vícebuněčný organismus.

Testovací organismy využívané v mikrobiotestech mohou představovat bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí, rybí tkáňové kultury atd. Tyto organismy se dlouhodobě uchovávají v klimatickém stavu, lyofilizovaném stavu nebo v imobilizované formě a podle potřeby se mohou oživit před vlastním testováním. Dále již samotný název mikrobiotest napovídá, že je miniaturizovaný. Jako testovací nádoby se používají zkumavky, kyvety nebo mikrotitrační destičky. Doba vlastního akutního testu toxicity se zkracuje a konečný výstup z testu může mít různý charakter, např. počet mrtvých nebo nepohyblivých organismů, změna absorbance, fluorescence nebo luminiscence atd. [56, 57, 58, 60]

➤ **Testy 3. generace** – Jedná se o třetí generaci ekotoxikologických testů. Testy třetí generace jsou biosenzory, biosondy a biomarkery, pomocí jichž můžeme detekovat případné poruchy v ekosystému. V současné době jsou však na úrovni základního výzkumu. V nadcházejících obdobích se jejich uplatnění očekává zejména v on-line monitorovacích systémech a screeningových testech toxicity. [57, 58]

3.4.2.3. Podle úrovně provedení

Testy toxicity se provádějí na třech úrovních, a to na úrovni buněk a tkání, na úrovni jedinců (organismů) a na úrovni společenstev (biocenóz).

➤ **Testy na úrovni buněk a tkání** se používají pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na organismech. Výhodou je jejich dobrá reprodukovatelnost, vysoká citlivost, nízké finanční a časové nároky. Naopak nevýhodou je značná odlišnost výsledků "in-vitro" od výsledků obdržených "in-vivo". Přesto se testování na úrovni buněk jeví jako vhodné pro studování možného toxikologického účinku na živé organismy.

➤ Většina testů se však provádí **na úrovni organismů**. U těchto testů se můžeme setkat s potížemi spojenými s reprodukovatelností. Odpověď jednotlivých organismů na přítomnost toxických látek není jednotná, ovlivňuje ji mnoho faktorů, například biologická dostupnost, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace nebo schopnost škodlivou látku

odbourávat atd. Každý organismus reaguje na přítomnost toxického materiálu jiným způsobem. K získání co nejkomplexnější informace o jeho toxickém působení na živé organismy je tedy nezbytné použít k testování vždy více druhů. Zapojením většího počtu testovacích organismů roste informace o zkoumaném vzorku a zvyšuje se tak výpovědní hodnota celé metody.

➤ **Na úrovni biocenóz** se sleduje toxický účinek v přírodě či na modelu blízkém přírodě. Negativem při testování na modelu jsou obtíže při vytváření identických přírodních podmínek, což vede ke snížené reprodukovatelnosti výsledků těchto testů. Další nevýhodou je, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně; organismy mohou různě reagovat na určitý druh toxikantu. Navíc změny ve složení společenstev nemusí být vždy vyvolány toxickým účinkem, ale mohou být způsobeny narušením potravního řetězce apod. [56, 61]

3.4.3. Provedení ekotoxikologických testů

3.4.3.1. Princip testů

➤ **Limitní test** – V limitním testu se vzorek o neznámé toxicitě podrobí první zkoušce s testovacími organismy. Cílem tohoto testu je zjistit, zda látka vykazuje toxické účinky či nikoliv. Používají se dvě paralelní nasazení se dvěma kontrolami. Nedojde-li k úhynu žádného organismu, je limitní test hodnocen jako negativní a přistoupí se k ověřovacímu testu.

➤ **Ověřovací test** – Negativní výsledek limitního testu se ověřuje v šesti paralelních nasazeních. Nedojde-li v testovaných roztocích k úhynu, imobilizaci či inhibici převyšující o 10 % úhyn, imobilizaci či inhibici v kontrole, je i zde výsledek hodnocen jako negativní. Další testování se neprovádí. Je-li výsledek pozitivní, záleží další postup na míře úhynu, imobilizace nebo inhibice. V případě mortality, imobilizace nebo inhibice nižší než 50 % se další testy neprovádějí a zjištěné skutečnosti se zaznamenají do protokolu. Překročí-li mortalita, imobilizace nebo inhibice 50 %, přistupuje se k předběžnému testu.

➤ **Předběžný test** – Účelem tohoto testu je určení koncentračního rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu LC50, EC50 nebo IC50 testované látky. Používá se zde zpravidla 10 koncentrací vzorku, volených v širokém rozpětí. Do tohoto testu se nasazuje menší počet pokusných organismů a obvykle postačuje testovat jednu koncentrační řadu. Cílem je zjistit nejvyšší koncentraci látky, při které ještě nedochází k úhynu, imobilizaci či inhibici (OC_0) a nejnižší koncentraci, která již působí letálně (OC_{100}).

➤ **Základní test** – Základní test slouží k vlastnímu určení hodnoty LC50, EC50 nebo IC50. Test se sestavuje zpravidla ze 7 různých koncentrací vzorku v rozmezí stanoveném předběžným testem. Ředění se provádí tak, aby kolem předpokládané hodnoty LC50, EC50 nebo IC50 došlo k 5 až 95% úhynu, imobilizaci nebo inhibici. Jako nejvyšší a nejnižší koncentrace ředící řady se volí limitní koncentrace zjištěné orientačním testem. Pro každou koncentraci se provádějí 2 až 3 paralelní nasazení. Po určité době expozice dané konkrétním testem se odečítá počet uhynulých či imobilizovaných organismů nebo se měří délka kořenů rostlin. Ze zjištěných údajů se počítá hodnota LC50, EC50 nebo IC50. Na začátku i na konci pokusu se zaznamenává teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH v každé testované koncentraci. [53]

3.4.3.2. Plánování testu a interpretace dat

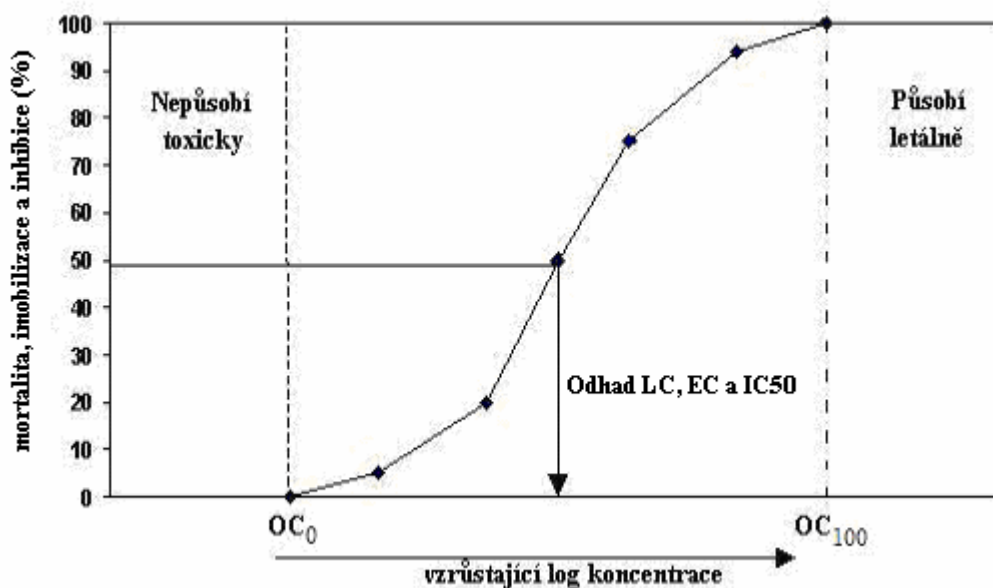
Volba koncentračních řad

Nejvyšší koncentrace vzorku z orientačního testu, která ještě nepůsobí na organismy toxicky, se označuje jako orientační koncentrace 0 (OC_0); nejnižší koncentrace, při které dochází k úplnému úhynu testovacích organismů jako orientační koncentrace 100 (OC_{100}).

Interval zpravidla sedmi koncentrací v rozmezí OC_0 až OC_{100} je třeba rozdělit tak, abychom v ideálním případě po provedení testu obdrželi 5 hodnot tzv. parciálních mortalit (v případě sedmi koncentrací), tzn. úhynů větších než 0 % a menších než 100 %. Způsob volby a rozvržení testovaných koncentrací zobrazuje obrázek 10. Jedna koncentrace by se měla co nejvíce blížit hodnotě LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} , dvě by měly být mezi hodnotou OC_0 a LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} , dvě mezi OC_{100} a LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} a dvě koncentrace by měly odpovídat hodnotám OC_0 a OC_{100} . Rozvržení koncentrací by mělo být okolo hodnoty LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} symetrické. Koncentrační řada by měla být logaritmická, následující koncentrace by měla být vždy k-krát větší nežli předchozí.

Koeficient k se vypočítá z následujícího vztahu, kde n představuje počet volených koncentrací, obvykle 7

$$\log k = \log \frac{OC_0 / OC_{100}}{n - 1}. \quad (1)$$



Obrázek 10: Způsob volby testovaných koncentrací v intervalu OC_0 až OC_{100} [53]

Interpretace výsledků

Cílem testů je stanovit hodnotu LC_{50} , EC_{50} nebo IC_{50} , popřípadě další ekotoxikologické hodnoty, jako jsou $NOEC$, $LOEC$.

Hodnota $NOEC$ (No Observed Effect Concentration) – koncentrace, při které ještě nebyl vyvolán pozorovatelný efekt.

Hodnota $LOEC$ (Lowest Observed Effect Concentration) – odpovídá nejnižší koncentraci, při které byl pozorován škodlivý účinek.

Hodnota LD50 (Lethal Dose) – letální dávka testované látky, která vyvolá úhyn 50 % testovaných organismů.

Hodnota LC50 (Lethal Concentration) – letální koncentrace testované látky, která vyvolá úhyn u 50 % testovaných organismů.

Hodnota EC50 (Effective Concentration) – efektivní koncentrace testované látky, která vyvolá pozorovatelný účinek u 50 % testovaných organismů.

Hodnota IC50 (Inhibitory Concentration) – inhibiční koncentrace testované látky, která vyvolá inhibici u 50 % testovaných organismů.

Hodnoty bývají udávány v jednotkách mg/l nebo ml/l. Podle těchto hodnot lze testovanou látku zařadit do tříd toxicity a odhadnout míru jejího škodlivého působení na organismy.

Možností, jak určit ze získaných dat hodnotu LC50 nebo EC50, je více. Každá má určité přednosti i nedostatky. Závislost mortality nebo imobilizace na koncentraci má sigmoidální charakter. Takovou závislost však nelze popsat přesnou rovnicí, pomineme-li polynomy vyšších stupňů. Je třeba získaná data určitým způsobem transformovat. Nejjednodušší je postavit proti hodnotám mortality nebo imobilizace logaritmy koncentrací a závislost vyjádřit pomocí lineární regrese. V bodě LC50 nebo EC50 má totiž křivka inflexní bod a v jejím okolí je její průběh přibližně lineární.

Nevýhodou výše uvedeného způsobu výpočtu je, že přímka nekopíruje dostatečně úmrtnostní nebo imobilizační křivku. Při koncentracích nižších LC50 a EC50 je nad křivkou a v koncentracích vyšších je pod ní. Tuto systematickou odchylku se snaží napravit probitová analýza, která vhodným způsobem transformuje data na tzv. probity, které již mají na logaritmu koncentrace přibližně lineární závislost. Převod dat vyjádřených v procentech lze na probity převést pomocí tabulky (příloha č. 1). Vhodnější však je použít výpočetní program upravený pro PC.

Jestliže při opakovaném měření téhož děje nejsou získané hodnoty identické, ale pohybují se kolem určité střední hodnoty, mluvíme o rozptylu. Průměr vypočtený z těchto hodnot je nepřesný a nejistý. Míru této nejistoty lze vyjádřit kvantitativními parametry, kterými jsou rozptyl (variance), směrodatná odchylka s nebo směrodatná chyba průměru s_x :

$$\frac{\sum x^2}{n-1} = s^2 = \text{rozptyl} \quad (2)$$

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}. \quad (3)$$

x = odchylka jednotlivé nadměrné hodnoty x od průměrné hodnoty \bar{x}

n = počet jednotlivých měření

s = směrodatná odchylka

$\sum x^2$ = součet čtverců odchylek

s_x = střední chyba průměru

Tento jednoduchý postup je ovšem přístupný pouze při splnění určitých podmínek, jako například dostatečný počet měření a normální rozložení četnosti. [12, 52, 53]

3.5. Vybrané ekotoxikologické biotesty

Biologické testy toxicity (biotesty, bioassays, laboratorní zkoušky toxicity) jsou používány pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek. Význam biologických testů spočívá v postižení souhrnu účinků všech přítomných komponent v testovaném roztoku na testovaný materiál (organismus, kultura, tkáň, buňka). Slouží také ke zjištění možného toxického vlivu látek na životní prostředí.

Protože v rámci této diplomové práce se bude stanovovat ekotoxicitu léčiv, která se vyskytují především ve vodních složkách životního prostředí, budou ekotoxikologické testy prováděny především na organismech vodního prostředí. Testy na organismech vodního prostředí jsou vhodné pro ekotoxikologické hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek nebo i léčiv, dále také odpadů na skládkách, havarijních průniků odpadních vod do povrchových či podzemních zdrojů. [61]

3.5.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bíle *Sinapis Alba*

Účel testu

Test byl vyvinut k testování účinků odpadních vod využívaných pro závlahy. Při této zkoušce se využívá klíčících semen hořčice bílé. [61]

Testovací organismus

Testovacím organismem jsou semena hořčice bílé (*Sinapis alba*). Hořčice bílá (obr. 8, 9) patří do čeledi brukvovitých, *Brassicaceae*. Je to jednoletá, časně jarní rostlina pocházející z planých druhů (*Brassica carinata*) z jihovýchodního Středomoří, kde byla pěstována starověkými civilizacemi již 2000 let před naším letopočtem. V Evropě začala být pěstována v raném středověku. Lodyhu má vzpřímenou, 60 až 150 cm vysokou s listy jasně zelené barvy. Semena jsou kulovitá až oválná, žluté barvy. Hořčice bílá má poměrně nízké nároky na půdu a klimatické podmínky, daří se jí v chladnějších a vyšších výrobních oblastech. Klíčí při teplotě 1 až 2 °C. Je poměrně citlivá na půdní škraloup a velmi citlivá na triazinové herbicidy. [58, 62, 63]



Obrázek 11: Květy hořčice bílé [62]



Obrázek 12: Semena hořčice bílé [64]

Princip testu

Princip testu spočívá v kultivaci semen za standardních podmínek v různých koncentracích testované látky. Test probíhá při teplotě $20 \pm 2^\circ\text{C}$, bez osvětlení, po dobu 72 hodin. Vybraná (nezdeformovaná, nepoškozená a odlišně nezbarvená) semena hořčice bílé se vkládají do Petriho misek na podložky nasycené pracovním roztokem. Při vkládání se dodržuje bezpečná vzdálenost mezi jednotlivými semeny tak, aby nedocházelo k vzájemnému ovlivňování při klíčení. Počet semen v jedné koncentraci je 30 kusů s požadavkem 5 ml roztoku na Petriho misku o průměru 120 až 140 mm. Současně se stejným způsobem nasadí semena do ředící vody bez přítomnosti testované látky – kontrola. Po 72 hodinách působení se v jednotlivých koncentracích i v kontrole stanoví počet vyklíčených semen a přesně měří délka kořenů. Pro každou koncentraci a kontrolu se vypočítá aritmetický průměr délky kořenů L v mm a vypočítá se inhibiční koncentrace IC růstu kořene v testované látce v porovnání s nasazenou kontrolou. Pokud testovaná látka působí na růst kořene stimulačně, výpočet IC se neprovádí. [61, 63]

Platnost a vyhodnocení testu

V kontrole musí být dosaženo klíčivosti alespoň 90 % a zjištěná hodnota IC_{50} dichromanu draselného pro tento test musí být ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard.

Výsledky testů se vyhodnocují graficky nebo s využitím počítačové techniky. Základem pro hodnocení účinků testované látky na semenech hořčice bílé je průměrná délka kořene zjištěná v testovacích miskách ve srovnání s průměrnou délkou kořene v kontrole. Nevyklíčená semena se započítávají do průměru jako nulová délka kořene, stejně jako semena, která vyklíčí, ale nevytvorí kořen. [61, 63]

3.5.2. Daphtoxkit FTM

Účel testu

Metodika používaná při testech na korýších je ČSN EN ISO 6341, kterou se zjišťuje inhibice pohyblivosti perlooček. Cílem testu je zjištění vlivu vodou vyluhovaných testovaných látek nebo vodných výluhů odpadů na mortalitu a imobilizaci (tj. makroskopicky pozorovatelná neschopnost samostatného prostorového pohybu) drobného korýše *Daphnia magna* (obr. 13). [61, 65]

Testovací organismus

Perloočky (*Cladocera*) je podřád korýšů ze třídy lupenonožců (*Branchiopoda*). Mají volnou hlavu a tělo uzavřené v dvojchlopňové schránce. První pár tykadel je malý, druhý pár je rozvětvený a je používán při pohybu. Mají 4 až 6 párů hrudních nožek, filtrujících drobnohlednou potravu nebo lapajících kořist. Zadeček bez končetin je zakončen drápkovitou vidličkou. Složené oči splývají v jediné oko. Vývoj je přímý. Žijí hlavně ve sladkých vodách v planktonu, na rostlinách nebo na dně nádrží. Některé perloočky pronikly i do moře. Jsou významnou potravou ryb. V ČR žije asi 90 druhů perlooček. [66]



Obrázek 13: *Daphnia magna* [67]

Princip testu

Dormantní vajíčka korýše *Daphnia magna* jsou chráněna chitinovou kapslí. Mohou tak být skladována po dlouhou dobu bez ztráty jejich životaschopnosti. Líhnutí vajíček ve vhodných specifických podmínkách (20 °C, 10⁴ lux) je započato 3 až 4 dny před začátkem testu. Do každé koncentrace o objemu 10 ml testované látky se nasazuje po 5 kusech vylíhnutých dafnií, stejným způsobem se nasazuje i kontrola. Test probíhá po dobu 48 hodin, při teplotě 20 ± 2 °C, bez aerace, bez osvětlení a bez krmení perlooček. Během testu se zaznamenává chování (imobilizace) a úhyn perlooček za 24 hodin a 48 hodin. [56, 61, 65, 68]

Platnost a vyhodnocení testu

Test se považuje za platný, jestliže koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích na konci testu je větší nebo rovna 2 mg/l a koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace. Správnost přípravy pracovních roztoků a použití životaschopných jedinců limituje hranice maximálně 10 % mortality či imobilizace v kontrolním roztoku. Zjištěná hodnota EC50 pro dichroman draselný musí být ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard (od 0,6 mg/l do 1,7 mg/l). Výsledkem testů jsou hodnoty EC50, LC50, vyhodnocují se graficky nebo s využitím počítačové techniky. [61, 65, 68]

3.5.3. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Účel testu

Tento test byl vyvinut pro testování účinků vod především z oblastí ústí řek a mořského prostředí. Často se také využívá v testech akutní toxicity ve farmakologii. Cílem testu je zjištění vlivu testovaných látek na mortalitu žábřonožky *Artemia salina* (obr. 14). [69, 70]

Testovací organismus

Řád žábřonožek (*Anostraca*) patří do třídy lupenonožců (*Branchiopoda*),. Tělo mají vždy bez schránky, protáhlé a měkké, složené z čtených článků. Dorůstají 5 až 70 mm. Žábřonožka slanisková dorůstá 12 až 18 mm a žije až 4 měsíce. Larvy se líhnou z trvalých vajíček označovaných jako cysty (obr. 15). Na hlavě má nečlánkovaná nitkovitá tykadla prvního páru

a mohutná tykadla druhého páru. Z jejich základního článku často vyrůstají různé charakteristické výrůstky, jež slouží jako významné determinační znaky. Na bocích hlavy se nalézají velké stopkaté složené oči. Hrud' se skládá z jedenácti článků, z nichž každý nese ventrálně pár listových plovacích nožek. Zadeček se skládá z devíti článků; první dva články jsou spolu víceméně srostlé, nesou pohlavní orgány. U samic bývá v těchto místech upevněn nápadně zbarvený vak s vajíčky.

Žábřonožky žijí ve stojatých vodách, často především v tůňkách vytvořených táním sněhu apod. Žábřonožka slanisková, *Artemia salina*, je kosmopolitně rozšířený druh, který je velmi hojný v přímořských a vnitrozemských tůňkách, slaných jezerech a solných dolech s mírně až velmi slanou vodou. Na příhodných lokalitách je možný výskyt i na našem území. Jiným druhem žábřonožek použitelným pro testy toxicity je *Artemia franciscana*. [69, 71]



Obrázek 14: Nauplium *Artemie salina* [69]



Obrázek 15: Cysty *Artemie salina* [69]

Princip testu

Pro testování se používají čerstvě vylíhnutí jedinci, tzv. nauplia. Líhnutí se obvykle provádí tak, že se do laboratorní mořské vody, zpravidla o salinitě 1,2 až 3,0 ‰ NaCl, odebere malé množství cyst. Vodu je dobré udržovat v mírném pohybu. Toho se nejlépe docílí provzdušňováním slabým proudem vzduchu. Tím se zajistí i adekvátní aerace. Optimální teplota pro líhnutí je 27 až 29 °C, kdy k vylíhnutí dochází přibližně do 18 hodin. Snížením teploty na 25 °C nedojde ke změně v citlivosti nauplií, ale k prodloužení doby líhnutí. Nevylíhlá vajíčka obvykle leží na dně, prázdné skořápky plavou na hladině. Bez krmení je životnost nauplií v ideálních podmínkách 96 až 120 hodin.

Testované koncentrace zkoumaného vzorku se připravují ředěním laboratorní mořskou vodou. Do Petriho misek o průměru 60 mm se odměří 10 ml zkoumaného roztoku. Podle uvážení se volí 2 až 3 paralelní nasazení. S testem se nasazuje minimálně jedna kontrola. Do každé Petriho misky se odloví 10 nauplií žábřonožek. Vzhledem k velké ploše hladiny a tudíž dostatečnému přestupu kyslíku lze misku zakrýt víčkem. Během testu se žábřonožky nekrmí. Testovaný roztok se ani neprovzdušňuje. Po stanovené době se počítají a zaznamenávají uhynulé žábřonožky. Odečítání uhynulých jedinců se provádí pouhým okem. Nejčastěji se za dobu testu volí 24 a 48 hodin. [69, 71]

Platnost a vyhodnocení testu

Touto zkouškou se stanovuje procento uhynulých nauplií *Artemia salina* v různých koncentracích k určení hodnoty LC50. Za uhynulé jsou považovány takové, které již nevykazují po mechanickém podráždění ani nepatrný pohyb vycházející z některé části jejich těla. Test akutní toxicity na mořském koryši *Artemia salina* je s výjimkou testovacího organismu a kultivačního média shodného uspořádání, provedení, platnosti a vyhodnocování s testem na *Daphnia magna*. [71, 72]

3.5.4. Thamnotoxkit FTM

Účel testu

Tento test je vhodný pro hodnocení tuhých odpadů a kalů, říčních sedimentů a odpadních vod. Byl také srovnáván s 48 hodinovým standardním testem akutní toxicity s *Daphnia magna*. Srovnáním párů dat pro 43 čistých chemikálií (mimo jiné z 16 výtoků z farmaceutických závodů) byly nalezeny velmi významné korelační vztahy mezi citlivostmi obou koryšů k testovaným látkám. Ukázalo se tak, že Thamnotoxkit FTM může být používán jako alternativa ke konvenčnímu testu s perloočkami. Cílem testu je zjištění vlivu testovaných látek na mortalitu organismu *Thamnocephalus platyurus*. [56, 73]

Testovací organismus

Thamnocephalus platyurus (obr. 16) patří do řádu žábronožek (*Anostraca*) do třídy lupenonožců (*Branchiopoda*). Podobně jako *Artemia salina* mají tělo vždy bez schránky, protáhlé a měkké, složené z četných článků. Dorůstají délky 5 až 70 mm, larvy se líhnou z cyst (obr. 17). [69]



Obrázek 16: *Thamnocephalus pl.* [74]



Obrázek 17: Cysty *Thamnocephalus pl.* [75]

Princip testu

Principem tohoto testu je sledování mortality organismu *Thamnocephalus platyurus*. Inkubace cyst se zahajuje 20 až 22 hodin před začátkem testování toxicity. Provádí se ve standardní vodě ředěné destilovanou vodou v poměru 1 : 8 (2,5 ml standardní vody a 17,5 ml destilované vody), při teplotě 25 °C a kontinuálního osvětlení 4 000 lux. Následující den se pomocí mikropipety plní mikrodestička 1 ml různých koncentrací testovaného vzorku.

Nasazují se 3 koncentrační řady o 5 různých koncentracích. Ke každé řadě se provádí kontrola. Do každé jamky se nasazuje po 10 kusech živých organismů. Poté se mikrodestička překryje parafilmem a nechá potmě inkubovat při teplotě 25 °C. Doba inkubace je 24 hodin. Po uplynutí dané doby se počítají v každé testovací jamce mrtvé organismy a stanovuje se hodnota LC50. [76]

Platnost a vyhodnocení testu

Test se považuje za platný, pokud mortalita kontrolního vzorku nepřesahuje 10 %. Larvy jsou považovány za mrtvé, pokud během 10 sekund pozorování nevykazují žádný pohyb. Spočítáním mrtvých jedinců se stanoví procento uhynulých nauplií *Thamnocephala platyurus* v různých koncentracích. Test akutní toxicity na *Thamnocephalus platyurus* je rovněž prováděn s organismy vylíhlymi z cyst. Taktéž jeho provedení, platnost a vyhodnocení je podobné jako u testu s *Daphnia magna*. Výsledkem testu je hodnota LC50. [72, 76]

3.5.5. Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Účel testu

Test se používá k testování toxicity roztoků a suspenzí. Účelem je stanovit účinky testované látky na vegetativní růst okřehku menšího (*Lemna minor*). Testuje se inhibice růstu podle růstové křivky.

Testovací organismus

Taxonomicky patří *Lemna minor* (obr. 18) do oddělení rostlin krytosemenných (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložných (*Liliopsida*), čeledě *Lemnaceae*. Z hydrobiologického hlediska jej řadíme do tzv. měkké vegetace, která zahrnuje rostliny plovoucí na vodní hladině (natantní) a rostliny ponořené (submerzní). Okřehky porůstají hladinu stojatých vod a představují potravu pro ryby a vodní ptactvo. Za příhodných podmínek vytvářejí kompaktní porosty, které nepropouštějí světlo, což vede ke zhoršení jakosti vod pod nimi. Okřehek menší je drobná vodní rostlina s plochými lístky, kožovité konzistence, s jedním lístkem i kořínkem, zdravé kolonie jsou tvořeny 2 až 5 lístky. Okřehek má výborné akumulární schopnosti, pozorované zejména u sloučenin dusíku, fosforu a u těžkých kovů. [77]



Obrázek 18: *Lemna minor* [78]

Princip testu

Rostliny okřehku menšího se nechají růst v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku při teplotě $24 \pm 2^\circ\text{C}$ a osvětlení 6 500 až 10 000 lux. Počáteční množství inokulační kultury je 9 až 12 lístků (počet lístků musí být v každé nádobě identický). Délka doby expozice je 7 dní. Současně se nasadí testovací rostliny do kontrolního živného roztoku bez testované látky. V intervalu 24 hodin se kontroluje a zaznamenává stav rostlin a počet lístků. Cílem testu je kvantifikovat účinky látky na vegetativní růst okřehku. Účinek testované látky se posuzuje podle rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou a hmotnosti konečné biomasy.

Platnost a vyhodnocení testu

Srovnání růstu v testovaných roztocích a kontrole se stanovuje pomocí koncentrace IC₅₀, lze zjišťovat i hodnoty LOEC a NOEC. V některých případech může testovaná látka vykazovat stimulaci růstu, potom se hodnota IC₅₀ nestanovuje. Účinek testované látky se posuzuje podle rychlosti růstu, plochy pod růstovou křivkou nebo konečné biomasy.

Výsledky se považují za platné, pokud průměrný počet lístků v kontrole vzrostl po dobu testu na osminásobek, pH v kontrolním vzorku se nezměnilo o více než 1,5 jednotky a zjištěná hodnota 168hIC₅₀ dichromanu draselného je v rozsahu 10 až 60 mg/l. [77, 79, 80]

3.5.6. Rotoxkit FTM

Účel testu

Jedná se o jednoduchý a levný test. Jeho využití je možné pro monitorování tuhých odpadů a kalů, hloubkových vrtů, říčních sedimentů, odpadních vod a půd. Nevýhodou tohoto mikrobiotestu je velikost vířníků, která činí počáteční manipulaci s nimi obtížnější. Na druhou stranu je tento test zajímavý pro české podmínky, protože *Brachionus calyciflorus* je běžnou součástí našich vodních ekosystémů. [56, 81]

Testovací organismus

Testovací organismus představuje vířník *Brachionus calyciflorus* (obr. 19). Vířníci (*Rotatoria*) jsou mikroskopičtí bilaterálně symetriční živočichové, patřící do kmene hlístů. Délka jejich nesegmentovaného těla se pohybuje mezi 40 a 2 000 μm . Tělo se obvykle sestává ze tří základních částí – hlavy, trupu a nohy. Hlavová část je opatřena výraznou korunou neboli vířivým ústrojím sloužícím k pohybu a získávání potravy. Tělo vířníků pokrývá jednovrstevná pokožka se splynulými buňkami. Díky vysoké schopnosti reprodukce mohou dosáhnout velkých početností, a proto tvoří důležitou součást potravních sítí, ve kterých se podílejí na rychlém obratu biomasy. [82]



Obrázek 19: *Brachionus calyciflorus* [82]

Princip testu

Principem testu je sledování mortality organismu *Brachionus calyciflorus*. Inkubace cyst se zahajuje 16 až 18 hodin před začátkem testování toxicity při teplotě 25 °C a kontinuálního osvětlení 3 000 až 4 000 lux. Poté se vylíhnutí jedinci pomocí mikropipety a mikroskopu nasazují do testovací destičky. Testovací destička obsahuje pět řad pro pět testovaných koncentrací a šest jamek v každé řadě. Do každé jamky se nasazuje po pěti kusech živých organismů. Současně s testováním jednotlivých koncentrací se provádí kontrola. Poté se mikrodestička překryje parafilmem a nechá potmě inkubovat při teplotě 25 °C. Doba inkubace je 24 hodin. Po uplynutí dané doby se v testovacích jamkách pomocí mikroskopu počítají mrtvé organismy a stanovuje se hodnota LC50.

Platnost a vyhodnocení testu

Test se považuje za platný, pokud mortalita kontrolního vzorku nepřesahuje 10 %. Testované organismy jsou považovány za mrtvé, pokud během 5 sekund pozorování nevykazují žádný vnitřní nebo vnější pohyb. Z počtu mrtvých organismů se stanoví procento uhynulých jedinců *Brachionus calyciflorus* v různých koncentracích. Provedení, platnost a vyhodnocení testu je podobné jako u testu na organismu *Thamnocephalus platyurus* nebo *Daphnia magna*, výsledkem je hodnota LC50. [56, 81]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem zadané diplomové práce bylo ekotoxikologické hodnocení vybraných léčiv. Jako testované látky byly vybrány Diklofenak, Ibuprofen, Penicilin G a Ampicilin. Jedná se o farmaka, která se vyskytují převážně ve vodních složkách životního prostředí. Pro účely ekotoxikologického hodnocení byly zvoleny následující testy toxicity □ Thamnotoxkit FTM na testovacím organismu *Thamnocephalus platyurus*, Daphtoxkit FTM na testovacím organismu *Daphnia magna* a Rotoxkit FTM na testovacím organismu *Brachionus calyciflorus*. Dále byl vybrán test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*, který je standardním testem fytotoxicity, test na okřehku menším *Lemna minor*, patřící také mezi testy fytotoxicity a test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*, patřící mezi testy alternativní.

Vybraná farmaka byla v pevném skupenství ve formě bílého krystalického prášku. Byla proto převedena do roztoků o koncentracích 1 g/l. Jako rozpouštědlo byla použita destilovaná voda. V případě diklofenaku, který je ve vodě rozpustný jen částečně, bylo k lepšímu rozpuštění přidáno množství 15 g/l dimethylsulfoxidu (DMSO), což představuje 1,4 % z celkového objemu. Podle Sklenáře [71] by toto množství nemělo mít v porovnání s kontrolou statisticky významný vliv na průběh testu. Tato fakta byla potvrzena prováděním kontrol s přídávkem 1,4 % DMSO, které vykazovaly totožná ovlivnění testovaných organismů jako kontroly s pouze ředící vodou. Z toho bylo usouzeno, že vliv 1,4 % DMSO je zcela statisticky nevýznamný. Používání DMSO jako rozpouštědla doporučuje i Maršálek [72]. Podle tohoto autora množství do 3 % DMSO u řas, 5 až 7 % u koryšů, 5 až 10 % u ryb a až 20 % u bakterií tyto testovací organismy neovlivňuje.

Všechny používané koncentrace v toxikologických testech byly připraveny ředěním zásobních roztoků podle následující rovnice:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2, \text{ kde} \quad (4)$$

c_1 koncentrace zásobního roztoku testované látky

V_1 objem zásobního roztoku testované látky

c_2 požadovaná koncentrace testované látky

V_2 objem testovaného roztoku.

4.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis Alba*

Příprava ředící vody

Nejdříve byly připraveny čtyři zásobní roztoky. Na analytických vahách bylo naváženo 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1 litr. Následně byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Stejným způsobem byly připraveny další roztoky, ve kterých byly rozpuštěny navážky 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,59 g NaHCO_3 a 0,23 g KCl . Z každého zásobního roztoku bylo odtřeno 25 ml do 1 litrové odměrné baňky, která byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravená ředící voda byla 24 hodin sycena vzdušným kyslíkem a poté nechána 24 hodin odstát. Nakonec byla zkontrolována hodnota pH, která by se měla pohybovat v rozmezí $7,8 \pm 0,2$. Případně je nutno pH upravit roztokem 1 mol/l NaOH nebo 1 mol/l HCl.

Provedení testu

Na dno Petriho misky byla vložena 1 vrstva filtračního papíru, na který bylo nadávkováno pipetou 5 ml testovaného roztoku. Použité koncentrační řady stanovovaných léčiv pro předběžný a základní test jsou uvedeny v tabulce 9. Na navlhčený filtrační papír byla pinzetou pokládána a rovnoměrně rozmístěna přebraná semena hořčice bílé. Misky byly přikryty víčkem a uloženy do temného inkubátoru při teplotě 20 ± 2 °C. Po 72 hodinách inkubace byly misky vyjmuty z termostatu a u jednotlivých vyklíčených semen byla změřena délka kořene s přesností na 1 mm.

Tabulka 9: Koncentrační řady pro *Sinapis alba*

Testované léčivo	Předběžný test (koncentrační řada v mg/l)	Základní test (koncentrační řada v mg/l)
Diklofenak	5; 20; 60; 100; 250	25; 50; 75; 100; 150
Ibuprofen	10; 50; 100; 250; 500	50; 100; 125; 150; 200
Penicilin G	100; 250; 500; 750; 1000	500; 600; 650; 700; 750
Ampicilin	100; 250; 500; 750; 1000	–

Vyhodnocení výsledků

Pro každou koncentraci byl vypočítán aritmetický průměr délky kořene. Na základě průměrných délek kořenů v jednotlivých koncentracích byla spočítána inhibice růstu podle následujícího vzorce:

$$I_i = \frac{(L_c - L_v)}{L_c} \cdot 100, \text{ kde} \quad (5)$$

I_i inhibice růstu kořene (%) v dané koncentraci; je-li $I < 0$, jedná se o stimulaci růstu

L_c průměrná délka kořene v kontrole (mm)

L_v průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)

Poté byl sestaven graf závislosti inhibice růstu na dekadickém logaritmu koncentrace a z rovnice lineární regrese byla následně vypočtena výsledná hodnota IC₅₀. [61, 79]

4.2. Daphtoxkit FTM

Příprava standardní sladké vody

Dvoulitrová odměrná baňka byla naplněna přibližně 1 litrem destilované vody. Poté byla otevřena ampule označená číslem 1 obsahující koncentrovaný roztok NaHCO₃ a její obsah byl převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi s koncentrovanými roztoky, tj. jedna ampule označená číslem 2 (CaCl₂), jedna ampule s číslem 3 (MgSO₄) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Toto pořadí bylo dodrženo. Nakonec byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a protřepána.

Takto připravená standardní sladká voda sloužila jako médium pro inkubaci cyst a pro přípravu série roztoků toxikantů. Před jejím použitím pro inkubaci cyst a před přípravou roztoků toxikantů byla vždy 15 minut provzdušňována. Standardní sladká voda byla uchovávána v lednici.

Inkubace cyst *Daphnia magna*

Inkubace byla započata 3 dny před začátkem testů toxicity. Obsah ampule s cystami byl převeden na mikrosítka a pro odstranění stop skladovacího média byly cysty důkladně promyty vodou. Poté byla vajíčka prostřednictvím 15 ml provzdušněné standardní sladké vody přenesena na inkubační Petriho misku. Takto se nechala inkubovat po dobu 72 hodin při teplotě 20 až 22 °C za kontinuálního osvětlení 6 000 lux. Dvě hodiny před nasazením organismů do testu byly perloočky předkrmeny suspenzí řasy *Spirulina microalgae*.

Přenos neonatů do testovacích šachet

Přenos předkrmených *Daphnií* do testovacích šachet byl proveden pomocí mikropipety ve dvou krocích. Nejprve bylo z Petriho misky převedeno minimálně 20 neonatů do každé rozplavovací komůrky. Z nich poté bylo do dalších čtyř testovacích šachet přeneseno přesně po pěti organismech. Snahou přitom bylo přenést co nejméně kapaliny, aby nedocházelo ke změně koncentrací testované látky. Pro snadnější rozlišení jedinců byla použita světelná tabule s tmavými okraji.

Sloupce testovacích šachet byly označeny písmeny A, B, C, D, řádky písmenem X pro kontrolu a čísla 1 až 5 pro pět koncentrací testovaných léčiv. Použité koncentrační řady pro předběžný a základní test jsou uvedeny v tabulce 10. Všechny šachty v každém řádku byly plněny objemem 10 ml příslušné koncentrace. Testovací destička byla plněna postupně od nejnižších koncentrací. Nakonec byla testovací destička překryta parafilmem, zavřena víkem a vložena do temného inkubátoru o teplotě 20 °C na dobu 48 hodin.

Tabulka 10: Koncentrační řady pro Daphtoxkit FTM

Testované léčivo	Předběžný test (koncentrační řada v mg/l)	Základní test (koncentrační řada v mg/l)
Diklofenak	5; 10; 25; 100; 250	5; 15; 30; 50; 75
Ibuprofen	5; 10; 25; 100; 250	25; 50; 75; 100; 125
Penicilin G	100; 250; 500; 750; 1000	750; 850; 900; 950; 1000
Ampicilin	100; 250; 500; 750; 1000	750; 850; 900; 950; 1000

Vyhodnocení testu

Po 24 a 48 hodinách byla destička vyjmuta z inkubátoru a byl zjištěn počet mrtvých a imobilizovaných neonatů. Počet mrtvých a imobilizovaných neonatů byl pro každou koncentraci vyjádřen v procentuálních hodnotách, které se převedly na probitové hodnoty. Poté byl sestaven graf závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrací. Z rovnice lineární regrese byla následně zjištěna hodnota 24hEC₅₀ a 48hEC₅₀. [65, 68]

4.3. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Příprava standardní slané vody

Nejprve byl připraven zásobní roztok číslo 1 a 2. Složení zásobních roztoků bylo připraveno podle tabulky 11. Následně byla 1 litrová odměrná baňka naplněna 800 ml destilované vody a bylo do ní přidáno 23,96 g NaCl, 10,35 g MgSO₄·7H₂O, 20 ml zásobního roztoku č. 1 a 10 ml zásobního roztoku č. 2. Poté byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku a protřepána.

Tabulka 11: Složení laboratorní mořské vody

	Chemická sloučenina	Množství (g/l)
Zásobní roztok č. 1	MgCl ₂ ·6H ₂ O	325,0
	KCl	29,8
Zásobní roztok č. 2	CaCl ₂	29,98
	NaHCO ₃	20,10
	H ₃ BO ₃	0,60

Inkubace cyst *Artemia salina*

Do kádinky s laboratorní mořskou vodou byly odebrány cysty *Artemia salina*. Voda se udržovala slabým proudem vzduchu v mírném pohybu, čímž se zajistilo i provzdušňování. Proudění vzduchu bylo třeba nastavit tak, aby cysty vířily ve vodním sloupci a neležely na dně nebo na hladině. Cysty byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 72 hodin. Po uplynutí dané doby byli vylíhlí jedinci odebráni k nasazení do testu. Nevylíhlá vajíčka ležela na dně a prázdné skořápky plavaly na hladině.

Přenos nauplií do testovacích šachet

Pro testování byli použiti čerstvě vylíhlí jedinci, kteří byli přeneseni mikropipetou do rozplavovacích komůrek s příslušnými koncentracemi stanovovaných léčiv. Použité koncentrační řady pro předběžný a základní test jsou uvedeny v tabulce 12. Odtud bylo do dalších tří testovacích šachet přeneseno po 10 organismech. Při jakémkoli odebrání bylo snahou společně s nauplií přenést co nejméně kapaliny. Pro snadnější rozlišení jedinců byla použita světelná tabule s tmavými okraji.

Sloupce testovacích šachet byly označeny písmeny A, B, C, řádky písmenem X pro kontrolu a čísla 1 až 5 pro pět koncentrací testovaných léčiv. Všechny šachty v každém řádku byly plněny objemem 5 ml příslušné koncentrace. Plnění testovací destičky bylo prováděno postupně od nejnižších koncentrací k vyšším. Nakonec byla testovací destička překryta parafilmem, zavřena víkem a vložena do temného inkubátoru o teplotě 25 °C na dobu 48 hodin. Během testu se žábronožky v testovaných koncentracích nekrmily ani neprovzdušňovaly.

Tabulka 12: Koncentrační řady pro organismus *Artemia salina*

Testované léčivo	Předběžný test (koncentrační řada v mg/l)	Základní test (koncentrační řada v mg/l)
Diklofenak	5; 20; 50; 100; 250	25; 50; 75; 100; 150
Ibuprofen	10; 50; 100; 200; 400	50; 100; 125; 150; 200
Penicilin G	100; 250; 500; 750; 1000	700; 750; 800; 900; 1000
Ampicilin	100; 200; 400; 800; 1000	700; 750; 800; 900; 1000

Vyhodnocení testu

Po uplynutí inkubační doby byla destička vyjmuta z inkubátoru a byl zjištěn počet mrtvých žábronožek. Procentuální mortality organismů byly převedeny na probitové hodnoty. Dále byla sestrojena grafická závislost probitových hodnot na logaritmu koncentrace testovaných léčiv. Z rovnice lineární regrese byla následně zjištěna hodnota 48hLC50. [69]

4.4. Thamnotoxkit FTM

Příprava standardní sladké vody

Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna přibližně 800 ml destilované vody. Poté byla otevřena ampule s koncentrovaným roztokem označená číslem 1 (NaHCO₃) a její obsah byl kvantitativně převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi obsahujícími koncentrované roztoky, tj. dvě ampule označené číslem 2 (CaSO₄), jedna ampule s číslem 3 (MgSO₄) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Toto pořadí bylo dodrženo. Nakonec byla baňka doplněna destilovanou vodou do objemu 1 litru a protřepána.

Standardní sladká voda sloužila dále jako médium pro inkubaci cyst a jako ředící médium pro přípravu série roztoků toxikantů. Před jejím použitím byla vždy minimálně 15 minut provzdušňována. Standardní sladká voda byla uchovávána v lednici. [76]

Inkubace cyst *Thamnocephalus platyurus*

Inkubace cyst byla provedena 24 hodin před začátkem testování a prováděla se ve zředěné standardní sladké vodě. Zředěná standardní sladká voda byla připravena smícháním 17,5 ml destilované vody s 2,5 ml standardní sladké vody. Vialka s cystami byla naplněna 1 ml zředěné standardní sladké vody a byla 30 minut protřepávána. Poté byly cysty kvantitativně přeneseny do malé Petriho misky, kam bylo přidáno 10 ml zředěné standardní sladké vody. Cysty se nechaly inkubovat při teplotě 25 °C po dobu 20 až 24 hodin za kontinuálního osvětlení (3 000 až 4 000 lux).

Přenos neonatů do testovacích šachet

Přenos čerstvě vylíhlých jedinců koryše *Thamnocephalus platyurus* byl proveden pomocí mikropipety ve dvou krocích. Nejdříve bylo přibližně 40 jedinců převedeno z Petriho misky do jednotlivých rozplavovacích komůrek. Z nich poté bylo do dalších tří testovacích šachet přeneseno přesně po 10 organismech. Snahou přitom bylo přenést co nejméně kapaliny. Pro snadnější rozlišení jedinců byla použita světelná tabule s tmavými okraji.

Řádky testovacích šachet byly označeny písmeny A, B, C, sloupce číslem 1 pro kontrolu a čísla 2 až 6 pro pět koncentrací testovaných léčiv. Použité koncentrační řady pro předběžný a základní test jsou uvedeny v tabulce 13. Všechny šachty v každém řádku byly plněny objemem 1 ml příslušné koncentrace. Testovací destička byla plněna postupně od nejnižších koncentrací po vyšší. Nakonec byla testovací destička překryta parafilmem, zavřena víkem a vložena do temného inkubátoru o teplotě 25 °C na dobu 24 hodin.

Tabulka 13: Koncentrační řady pro organismus *Thamnocephalus platyurus*

Testované léčivo	Předběžný test (koncentrační řada v mg/l)	Základní test (koncentrační řada v mg/l)
Diklofenak	1; 10; 25; 50; 100	5; 10; 20; 30; 40
Ibuprofen	10; 100; 250; 500; 750	150; 200; 250; 300; 350
Penicilin G	100; 250; 500; 750; 1000	700; 750; 800; 900; 1000
Ampicilin	100; 250; 500; 750; 1000	500; 600; 650; 750; 900

Vyhodnocení testu

Po skončení 24 hodinové inkubační doby byla testovací destička vyjmuta z inkubátoru a byl zjištěn počet mrtvých organismů. Z celkového počtu mrtvých jedinců bylo pro každou koncentraci vypočítáno procento úmrtnosti. Hodnoty procentuální úmrtnosti se převedly na probitové hodnoty. Dále byla sestrojena grafická závislost probitových hodnot na logaritmu koncentrace testovaných léčiv. Z rovnice lineární regrese byla následně zjištěna hodnota 24hLC50. [76]

4.5. Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Příprava standardní vody

Do osmi 200 ml odměrných baněk byly připraveny tři zásobní roztoky pro makrosložky a pět zásobních roztoků pro mikrosložky. Složení a koncentrace jednotlivých roztoků jsou uvedeny v tabulce 14. Poté byly připravené zásobní roztoky sterilizovány v autoklávu a použity k přípravě konečného živného média. Do jednolitrové odměrné baňky se k přibližně 900 ml destilované vody přidalo po 20 ml každého ze zásobních roztoků 1, 2 a 3. Následně se přidalo po 1 ml každého zásobního roztoku 4, 5, 6, 7 a 8, aby se zamezilo srážení. Hodnota pH se pohybovala v rozmezí $5,5 \pm 2$, v opačném případě by se musela upravit přidavkem co nejmenšího objemu roztoku NaOH nebo HCl. Nakonec byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku.

Tabulka 14: Živné médium pro okřehek menší *Lemna minor*

Roztok	Makrosložky (mg/l)		Roztok	Mikrosložky (mg/l)	
I.	KNO ₃	350,0	IV.	H ₃ BO ₃	0,120
I.	KH ₂ PO ₄	90,0	V.	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,180
I.	K ₂ HPO ₄	12,6	VI.	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,044
II.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	100,0	VII.	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,180
III.	Ca(NO ₃)·4H ₂ O	295,0	VIII.	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,760
			VIII.	EDTA	1,500

Provedení testu

Do 100 ml odměrných baněk byly nejdříve připraveny příslušné koncentrace testovaných léčiv. Použité koncentrační řady pro předběžný a základní test jsou uvedeny v tabulce 15. Z důvodu malého množství testované látky nebyl test s penicilinem G a ampicilinem proveden. Připravené objemy jednotlivých koncentrací byly převedeny do 150 ml kádinek. Poté bylo do každé kádinky pomocí skleněné tyčinky nasazeno 10 lístků okřehku menšího *Lemna minor*. Počet lístků v každé koncentraci i kontrole byl stejný. Nakonec byly kádinky překryty potravinářskou fólií a vystaveny kontinuálnímu osvětlení se světelnou intenzitou 6 500 až 10 000 lux.

Tabulka 15: Koncentrační řady pro *Lemna minor*

Testované léčivo	Předběžný test (koncentrační řada v mg/l)	Základní test (koncentrační řada v mg/l)
Diklofenak	5; 10; 50; 100; 250; 500	75; 100; 125; 150; 175; 200
Ibuprofen	5; 10; 50; 100; 250; 500	75; 100; 125; 150; 175; 200
Penicilin G	–	–
Ampicilin	–	–

Vyhodnocení výsledků

Účinek testovaných léčiv se posuzoval podle rychlosti růstu a podle množství konečné biomasy. Při stanovování inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí byl pro každou koncentraci a kontrolu spočítán počet lístků na konci testu. Jednotlivé růstové rychlosti byly vypočítány podle vzorce:

$$\mu_i = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}, \text{ kde} \quad (6)$$

μ_i růstová rychlost v testované koncentraci

N_0 počet lístků na počátku testu

N_n počet lístků na konci testu

t_n doba trvání testu (dny).

Z vypočítaných hodnot μ pro každou testovanou koncentraci a kontrolu se vypočítala inhibice růstu I_μ v % podle následující rovnice:

$$I_\mu = \frac{(\mu_c - \mu_i)}{\mu_c} \cdot 100, \text{ kde} \quad (7)$$

μ_i růstová rychlost v testované koncentraci

μ_c růstová rychlost v kontrole.

V případě stanovování inhibice růstu porovnáním hmotnosti konečné biomasy byla pro každou koncentraci a kontrolu zjištěna hmotnost konečné biomasy. Inhibice růstu na základě porovnání konečného množství biomasy I_B se vypočítala podle vzorce:

$$I_B = \frac{(B_c - B_i)}{B_c} \cdot 100, \text{ kde} \quad (8)$$

I_B procento redukce biomasy

B_i konečná biomasa v testované koncentraci

B_c konečná biomasa v kontrole.

Poté byly sestaveny grafy závislosti inhibicí I_μ a I_B na dekadickém logaritmu koncentrace a z rovnic lineárních regresí byly následně vypočteny výsledné hodnoty IC_{50} . [79, 80]

4.6. Rotoxkit FTM

Příprava standardní sladké vody

Standardní sladká voda je totožná se standardní sladkou vodou pro testovací organismus *Thamnocephalus platyurus*. Jednolitrová odměrná baňka byla naplněna přibližně 800 ml destilované vody. Poté byla otevřena ampule s koncentrovaným roztokem označená číslem 1 (NaHCO_3) a její obsah byl kvantitativně převeden do baňky. Tento krok byl opakován s ostatními ampulemi obsahujícími koncentrované roztoky, tj. dvě ampule označené číslem 2 (CaSO_4), jedna ampule s číslem 3 (MgSO_4) a jedna ampule s číslem 4 (KCl). Toto pořadí bylo dodrženo. Nakonec byla baňka doplněna destilovanou vodou do objemu 1 litru a protřepána. [81]

Inkubace cyst *Brachionus calyciflorus*

Inkubace cyst byla zahájena den před nasazením organismů do testu. Obsah jedné ampulky s cystami byl vyprázdněn a přenesen do inkubační Petriho misky. Bylo přidáno 10 ml připravené standardní sladké vody a poté byla Petriho miska vložena do inkubátoru. Cysty se nechaly inkubovat po dobu 18 hodin při teplotě 20 až 22 °C za kontinuálního osvětlení 3 000 až 6 000 lux.

Přenos neonatů do testovacích šachet

K testování se používají speciálně navržené testovací destičky. Každá destička obsahuje 1 líhnoucí žlábek, 6 rozplavovacích komůrek a 36 testovacích jamek. Nejprve bylo z Petriho misky převedeno několik jedinců do každé rozplavovací komůrky. Z nich poté bylo do dalších šesti testovacích šachet přeneseno přesně po pěti organismech. Snahou přitom bylo přenést co nejméně kapaliny. Pro přenos jedinců byla použita mikropipeta a pro jejich lepší rozlišení byl použita binokulární stereolupa.

Sloupce testovacích šachet byly označeny písmeny A, B, C, D, E a F, řádky písmenem X pro kontrolu a čísla 1 až 5 pro pět testovaných koncentrací. Všechny šachty v každém řádku byly plněny objemem 0,3 ml příslušné koncentrace. Testovací destička byla plněna postupně od nejnižších koncentrací. Nakonec byla testovací destička překryta parafilmem, zavřena víkem a vložena do temného inkubátoru o teplotě 25 °C na dobu 24 hodin.

Vyhodnocení testu

Po uplynutí 24 hodinové inkubační doby byla testovací destička vyjmuta z inkubátoru a pomocí binokulární stereolupy byl zjištěn počet mrtvých organismů v jednotlivých koncentracích. Z celkového počtu mrtvých jedinců bylo pro každou koncentraci vypočítáno procento úmrtnosti. Hodnoty procentuální úmrtnosti byly převedeny na probitové hodnoty. Dále byla sestrojena grafická závislost probitových hodnot na logaritmu koncentrace a z rovnice lineární regrese byla následně zjištěna hodnota 24hLC50. [56, 81]

5. VÝSLEDKY

Ekotoxicita vybraných léčiv byla hodnocena pomocí vybraných testů ekotoxicity uvedených a popsanych v experimentální části. U všech testů byly provedeny limitní, předběžné a základní testy. K ověření správnosti testů, kvality a citlivosti organismů byly provedeny referenční testy toxicity prostřednictvím standardu dichromanu draselného. V případě okřehku menšího *Lemna minor* byl proveden referenční test toxicity prostřednictvím standardu chloridu draselného. Na organismu *Brachionus calyciflorus* byl proveden pouze referenční a limitní test. Předběžné a základní testy jednotlivých léčiv na organismu *Brachionus calyciflorus* nebyly provedeny z důvodu vyčerpání ampulek s cystami. Výsledky jednotlivých ekotoxikologických testů byly pro přehlednost zpracovány do tabulek. V průběhu testů byla sledována kritéria podmiňující validitu testu: pH, teplota, množství kyslíku. Všechna tato kritéria byla ve shodě s podmínkami vyžadovanými pro jednotlivé testy.

5.1. Referenční testy

Všechny referenční testy byly prováděny podle stejné metodiky a stejných podmínek jako testy s testovanými látkami. Jako standard byl používán roztok dichromanu draselného a pro test na okřehku menším *Lemna minor* roztok chloridu draselného. Získané hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro referenční testy jsou uvedeny v následujících tabulkách a vyhovovaly limitům pro daný organismus a standard.

Tabulka 16: Referenční test inhibice růstu kořene pro organismus *Sinapis alba*

c (mg/l)	Průměrná délka kořene (mm)	Inhibice (%)	log c
0	40,4	0	
5	38,3	5,1	0,699
10	34,9	13,7	1,000
30	26,7	33,9	1,477
60	20,8	48,5	1,778
80	19,6	51,5	1,903
160	11,7	71,0	2,204

Hodnota 72hIC50 pro dichroman draselný na *Sinapis alba* byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 63,8 mg/l.

Rozmezí 72hIC50 uváděné pro referenční test inhibice růstu kořene *Sinapis alba* s K₂Cr₂O₇ je 50 až 80 mg/l.

Tabulka 17: Referenční test akutní toxicity pro organismus *Daphnia magna*

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	0	0	0	
0,32	0	30,0	0	4,476	-0,495
0,56	20,0	45,0	4,158	4,874	-0,252
1,00	60,0	65,0	5,253	5,385	0,000
1,80	80,0	75,0	5,842	5,674	0,255
3,20	100,0	100,0	8,09	8,09	0,505

Hodnoty EC50 pro dichroman draselný na organismu *Daphnia magna* byly zjištěny z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrací pomocí rovnice lineární regrese. Hodnota 24EC50 byla stanovena na 1,12 mg/l a hodnota 48hEC50 na 0,61 mg/l.

Hodnoty EC50 pro referenční test s *Daphnia magna* na $K_2Cr_2O_7$ jsou 1,03 mg/l pro 24 hodinový test a 0,75 mg/l pro 48 hodinový test.

Tabulka 18: Referenční test akutní toxicity *Artemia salina*

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	2,5	0	3,040	
5	2,5	40,0	3,04	4,747	0,699
10	5,0	50,0	3,355	5,000	1,000
30	40,0	55,0	4,747	5,126	1,477
40	57,5	67,5	5,202	5,468	1,602
60	80,0	100,0	5,842	8,09	1,778

Hodnota 48hLC50 pro dichroman draselný na vodním organismu *Artemia salina* byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrací pomocí regresní přímky a činila 9,9 mg/l. Hodnota 24LC50 byla stanovena na 31,1 mg/l.

Tabulka 19: Referenční test akutní toxicity *Thamnocephalus platyurus*

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	6,7	3,524	
0,032	23,3	4,261	-1,495
0,056	30,0	4,476	-1,252
0,100	40,0	4,747	-1,000
0,180	60,0	5,253	-0,745
0,320	90,0	6,282	-0,495

Stejným způsobem byla získána hodnota 24hLC50 pro dichroman draselný na korýši *Thamnocephalus platyurus*, která činila 0,100 mg/l.

Referenční hodnota LC50 pro 24 hodinový test akutní toxicity na *Thamnocephalus platyurus* s $K_2Cr_2O_7$ je 0,095 mg/l.

Tabulka 20: Referenční test akutní toxicity *Lemna minor*

c (g/l)	Porovnání rychlosti růstu		Porovnání hmotnosti konečné biomasy		log c
	Růstová rychlost μ	I_μ (%)	m (g)	I_B (%)	
0	0,230	0	0,0065	0	
5	0,157	31,7	0,0036	44,6	0,699
10	0,119	48,2	0,0034	47,7	1,000
20	0,067	70,8	0,0022	66,2	1,301
30	0,048	79,1	0,0009	86,2	1,477
40	0,026	88,7	0,0004	93,8	1,602
50	0	100,0	0,0002	96,9	1,699

Hodnoty 168hIC50 pro chlorid draselný na okřehku menším *Lemna minor* byly vyhodnoceny pomocí dvou metod – metody porovnání rychlosti růstu a metody porovnání hmotnosti konečné biomasy. Metodou porovnání rychlosti růstu byla hodnota 168hIC50 stanovena na 10,0 g/l a metodou porovnání hmotnosti konečné biomasy na 8,1 g/l.

Rozmezí 168hIC50 uváděné pro referenční test na okřehku menším *Lemna minor* s chloridem draselným je 5,5 až 10 g/l.

Tabulka 21: Referenční test akutní toxicity *Brachionus calyciflorus*

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	5,0	3,355	
3,2	15,0	3,964	0,505
5,6	20,0	4,158	0,748
10	30,0	4,476	1,000
18	45,0	4,874	1,255
32	95,0	6,645	1,505

V rámci diplomové práce byl také prováděn referenční test na vířníku *Brachionus calyciflorus*. Jako standard byl použit dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$. Hodnota 24hLC50 pro dichroman draselný na vířníku *Brachionus calyciflorus* byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrací pomocí regresní přímky a činila 11,9 mg/l.

Rozmezí hodnot LC50 pro daný standard referenčního testu na organismu *Brachionus calyciflorus* je 9,6 až 17,8 mg/l.

5.2. Limitní testy

Limitní testy byly provedeny u všech testů ekotoxicity. Jejich cílem bylo zjistit, zda koncentrace 100 mg/l testovaných léčiv vykazují ekotoxické účinky či nikoli. Jelikož ve všech testech testované koncentrace vykazovaly ekotoxikologické účinky, byla testovaná léčiva podrobena dalším testům ekotoxicity. Pouze v případě testu ampicilinu na organismu *Daphnia magna* koncentrace 100 mg/l nevykazovala žádné ekotoxické účinky. Výsledky limitních testů jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22: Limitní testy ekotoxicity

	Diklofenak 100 mg/l	Ibuprofen 100 mg/l	Penicilin G 100 mg/l	Ampicilin 100 mg/l
<i>Sinapis alba</i> I (%)	70,1	35,7	17,4	13,6
<i>Daphnia magna</i> Mortalita (%)	80,0	45,0	5,0	0
<i>Artemia salina</i> Mortalita (%)	70,0	50,0	16,7	13,3
<i>Thamnocephalus platyurus</i> Mortalita (%)	100,0	6,7	3,3	3,3
<i>Lemna minor</i> I (%)	30,6	39,0	–	–
<i>Brachionus calyciflorus</i> I (%)	40,0	5,0	5,0	30,0

5.3. Diklofenak

5.3.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Předběžný test byl proveden s roztoky diklofenaku o koncentracích uvedených v tabulce 9. Naměřené hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce 23.

Tabulka 23: Předběžný test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	33,8	0	
5	33,6	0,6	0,699
20	30,0	11,2	1,301
60	22,8	32,5	1,778
100	13,5	60,1	2,000
250	6,2	81,7	2,398

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 9. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 24.

Tabulka 24: Základní test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	33,8	0	
25	33,0	2,4	1,398
50	25,9	23,4	1,699
75	16,1	52,4	1,875
100	14,4	57,4	2,000
150	9,7	71,3	2,176

Hodnota 72hIC₅₀ byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 83,8 mg/l.

5.3.2. Daphtoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 10. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 25. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 25: Předběžný test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	
5	5,0	10,0	3,355	3,718	0,699
10	15,0	30,0	3,964	4,476	1,000
25	20,0	35,0	4,158	4,615	1,398
100	80,0	100,0	5,842	8,090	2,000
250	100,0	100,0	8,090	8,090	2,398

Z hodnot předběžného testu stanovených po 24 a 48 hodinách testování bylo určeno rozmezí základního testu. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 10. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 26.

Tabulka 26: Základní test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	
5	0	30,0	0	4,476	0,699
15	10,0	40,0	3,718	4,747	1,176
3	15,0	50,0	3,964	5,000	1,477
50	30,0	60,0	4,326	5,253	1,699
75	75,0	95,0	5,674	6,645	1,875

Hodnota 24hEC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 53,0 mg/l. Obdobně byl vyhodnocen i test po 48 hodinách, kde byla stanovena hodnota 48EC50 na 17,2 mg/l.

5.3.3. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 12. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 27. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 27: Předběžný test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
5	0	0	0,699
20	10,0	3,718	1,301
50	30,0	4,476	1,699
100	63,3	5,332	2,000
250	100,0	8,090	2,398

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 12. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 28.

Tabulka 28: Základní test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
25	10,0	3,718	1,398
50	36,7	4,668	1,699
75	50,0	5,000	1,875
100	60,0	5,253	2,000
150	100,0	8,090	2,398

Hodnota 48hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 74,0 mg/l.

5.3.4. Thamnotoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 13. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 29. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 29: Předběžný test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	6,7	3,524	
1	6,7	3,524	0
10	26,7	4,387	1,000
25	60,0	5,253	1,398
50	100,0	8,090	1,699
100	100,0	8,090	2,000

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 13. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 30.

Tabulka 30: Základní test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	6,7	3,524	
5	16,7	4,046	0,699
10	23,3	4,261	1,000
20	50,0	5,000	1,301
30	80,0	5,842	1,477
40	90,0	6,282	1,602

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 15,2 mg/l.

5.3.5. Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 15. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 31.

Tabulka 31: Předběžný test na okřehku menším *Lemna minor*.

c (mg/l)	Porovnání rychlosti růstu		Porovnání hmotnosti konečné biomasy		log c
	Růstová rychlost μ	I_{μ} (%)	m (g)	I_B (%)	
0	0,233	0	0,0021	0	
5	0,230	1,2	0,0020	2,4	0,699
10	0,221	5,0	0,0014	29,3	1,000
50	0,183	21,4	0,0009	58,5	1,699
100	0,164	29,6	0,0007	65,9	2,000
250	0	100,0	0,0005	75,6	2,398
500	0	100,0	0,0017	17,1	2,699

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 15. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 32.

Tabulka 32: Základní test na okřehku menším *Lemna minor*.

c (mg/l)	Porovnání rychlosti růstu		Porovnání hmotnosti konečné biomasy		log c
	Růstová rychlost μ	I_{μ} (%)	m (g)	I_B (%)	
0	0,230	0	0,0048	0	
75	0,220	4,5	0,0045	8,2	1,875
100	0,212	7,9	0,0043	12,4	2,000
125	0,198	13,9	0,0038	22,7	2,097
150	0,134	41,8	0,0017	64,9	2,176
175	0,084	63,5	0,0019	60,8	2,243
200	0,026	88,7	0,0006	87,6	2,301

Hodnota 168hIC₅₀ testu na okřehku menšího *Lemna minor* byla vyhodnocena pomocí dvou metod – metody porovnání rychlosti růstu a metody porovnání hmotnosti konečné biomasy. Metodou porovnání rychlosti růstu byla hodnota 168hIC₅₀ stanovena na 169,4 mg/l a metodou porovnání hmotnosti konečné biomasy na 142,2 mg/l.

Všechny výše uvedené hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro diklofenak, které byly získány prostřednictvím jednotlivých ekotoxikologických testů, jsou pro přehlednost prezentovány v tabulce 33.

Tabulka 33: Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro diklofenak.

Testovací organismus	Stanovovaná hodnota	Diklofenak (mg/l)
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	83,8
<i>Daphnia magna</i>	24hEC50	53,0
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50	17,2
<i>Artemia salina</i>	48hLC50	74,0
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24hLC50	15,2
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	169,4*
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	142,2**

* metoda porovnání rychlosti růstu

** metoda porovnání hmotnosti konečné biomasy

5.4. Ibuprofen

5.4.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Předběžný test byl proveden s roztoky ibuprofenu o koncentracích uvedených v tabulce 9. Naměřené hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce 34.

Tabulka 34: Předběžný test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	36,0	0	
10	35,8	0,6	1,000
50	27,3	24,2	1,699
100	21,2	41,1	2,000
250	14,0	61,1	2,398
500	4,7	86,9	2,699

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 9. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 35.

Tabulka 35: Základní test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	35,9	0	
50	26,9	25,1	1,699
100	21,2	40,9	2,000
125	17,1	52,4	2,097
150	16,5	54,0	2,176
200	12,0	66,6	2,301

Hodnota 72hIC₅₀ byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 122,2 mg/l.

5.4.2. Daphtoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 10. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 36. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 36: Předběžný test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	
5	0	5,0	0	3,355	0,699
10	5,0	20,0	3,355	4,158	1,000
25	5,0	25,0	3,355	4,326	1,398
100	45,0	70,0	4,874	5,524	2,000
250	95,0	100,0	6,645	8,090	2,398

Porovnáním zjištěných hodnot z tabulky 36 stanovených po 24 a 48 hodinách testování bylo určeno rozmezí základního testu. Použitá koncentrační řada pro základní test je uvedena v tabulce 10. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 37.

Tabulka 37: Základní test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	
25	10,0	20,0	3,718	4,158	1,398
50	20,0	35,0	4,158	4,615	1,699
75	30,0	45,0	4,476	4,874	1,875
100	45,0	85,0	4,874	6,036	2,000
125	65,0	90,0	5,385	6,282	2,097

Hodnota 24hEC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 106,4 mg/l. Obdobně byl vyhodnocen test i po 48 hodinách, kdy byla stanovena hodnota 48EC50 na 56,4 mg/l.

5.4.3. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 12. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 38. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 38: Předběžný test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	0	0	
10	26,7	4,387	1,000
50	30,0	4,476	1,699
100	43,3	4,824	2,000
200	56,7	5,176	2,301
400	73,3	5,613	2,602

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 12. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 39.

Tabulka 39: Základní test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
50	16,7	4,046	1,699
100	40,0	4,747	2,000
125	43,3	4,824	2,097
150	46,7	4,925	2,176
200	60,0	5,253	2,301

Hodnota 48hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 151,2 mg/l.

5.4.4. Thamnotoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 13. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 40. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 40: Předběžný test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	6,7	3,524	
10	3,3	3,188	1,000
100	6,7	3,524	2,000
250	43,3	4,824	2,398
500	100,0	8,090	2,699
750	100,0	8,090	2,875

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 13. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 41.

Tabulka 41: Základní test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
150	20,0	4,158	2,176
200	40,0	4,747	2,301
250	56,7	5,176	2,398
300	96,7	6,812	2,477
350	100,0	8,090	2,544

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 200,8 mg/l.

5.4.5. Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 15. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 42.

Tabulka 42: Předběžný test na organismu *Lemna minor*

	Porovnání rychlosti růstu		Porovnání hmotnosti konečné biomasy		
c (mg/l)	Růstová rychlost μ	I_{μ} (%)	m (g)	I_B (%)	log c
0	0,233	0	0,0034	0	
5	0,212	9,1	0,0031	10,1	0,699
10	0,202	13,4	0,0028	17,4	1,000
50	0,159	31,6	0,0026	26,1	1,699
100	0,137	41,4	0,0021	39,1	2,000
250	0,067	71,2	0,0013	62,3	2,398
500	0,026	88,8	0,0011	68,1	2,699

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 15. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 43.

Tabulka 43: Základní test na organismu *Lemna minor*

	Porovnání rychlosti růstu		Porovnání hmotnosti konečné biomasy		
c (mg/l)	Růstová rychlost μ	I_{μ} (%)	m (g)	I_B (%)	log c
0	0,230	0	0,0048	0	
100	0,179	22,2	0,0042	13,4	2,000
125	0,173	24,9	0,0039	19,6	2,097
150	0,168	26,8	0,0026	47,4	2,176
175	0,155	32,8	0,0032	34,0	2,243
200	0,128	44,3	0,0012	75,3	2,301
250	0,048	79,1	0,0005	90,7	2,398

Hodnota 168hIC50 testu na okřešku menšího *Lemna minor* byla vyhodnocena pomocí dvou metod – metody porovnání rychlosti růstu a metody porovnání hmotnosti konečné biomasy. Metodou porovnání rychlosti růstu byla hodnota 168hIC50 stanovena na 195,9 mg/l a metodou porovnání hmotnosti konečné biomasy na 165,5 mg/l.

Všechny výše uvedené hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro ibuprofen, které byly získány prostřednictvím jednotlivých ekotoxikologických testů, jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 44.

Tabulka 44: Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro ibuprofen.

Testovací organismus	Stanovovaná hodnota	Ibuprofen (mg/l)
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	122,2
<i>Daphnia magna</i>	24hEC50	106,4
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50	56,4
<i>Artemia salina</i>	48hLC50	151,2
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24hLC50	200,8
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	195,9*
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	165,5**

* metoda porovnání rychlosti růstu

** metoda porovnání hmotnosti konečné biomasy

5.5. Penicilin G

5.5.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Předběžný test byl proveden s roztoky penicilinu G o koncentracích uvedených v tabulce 9. Naměřené hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce 45.

Tabulka 45: Předběžný test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	36,0	0	
100	28,6	20,6	2,000
250	27,6	23,3	2,398
500	20,9	41,9	2,699
750	16,0	55,6	2,875
1000	13,8	61,7	3,000

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedena v tabulce 9. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 46.

Tabulka 46: Základní test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	35,9	0	
500	24,9	30,6	2,699
600	21,9	39,0	2,778
650	19,1	46,8	2,813
700	14,6	59,3	2,845
750	13,7	61,8	2,875

Hodnota 72hIC₅₀ byla zjištěna graficky pomocí regresní přímky a činila 653,4 mg/l.

5.5.2. Daphtoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 10. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 47. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 47: Předběžný test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	
100	0	5,0	0	3,355	2,000
250	10,0	10,0	3,718	3,718	2,398
500	15,0	15,0	3,964	3,964	2,699
750	30,0	35,0	4,476	4,615	2,875
1000	35,0	75,0	4,615	5,674	3,000

Porovnáním zjištěných hodnot z tabulky 47 stanovených po 24 a 48 hodinách testování bylo určeno rozmezí základního testu. Použitá koncentrační řada pro základní test je uvedena v tabulce 10. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 48.

Tabulka 48: Základní test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	
750	15,0	30,0	3,964	4,476	2,875
850	20,0	35,0	4,158	4,615	2,929
900	25,0	45,0	4,326	4,874	2,954
950	35,0	65,0	4,615	5,385	2,978
1000	40,0	80,0	4,747	5,842	3,000

Hodnota 48hEC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 878,5 mg/l. Hodnota 24hEC50 nebyla stanovena, protože nejvyšší koncentrace 1000 mg/l nezpůsobila úmrtnost přesahující 50 %. Byla tedy alespoň stanovena hodnota 24hEC25, která činila 874,4 mg/l.

5.5.3. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 12. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 49. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 49: Předběžný test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	0	0	
100	10,0	3,718	2,000
250	13,3	3,874	2,398
500	20,0	4,158	2,699
750	23,3	4,261	2,875
1000	96,7	6,812	3,000

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 12. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 50.

Tabulka 50: Základní test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
700	16,7	4,046	2,845
750	20,0	4,158	2,875
800	36,7	4,668	2,903
900	80,0	5,842	2,954
1000	100,0	8,090	3,000

Hodnota 48hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 797,2 mg/l.

5.5.4. Thamnotoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 13. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 51. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 51: Předběžný test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	6,7	3,524	
100	3,3	3,188	2,000
250	6,7	3,524	2,398
500	10,0	3,718	2,699
750	23,3	4,261	2,875
1000	93,3	6,476	3,000

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 13. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 52.

Tabulka 52: Základní test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
700	13,3	3,874	2,845
750	16,7	4,046	2,875
800	30,0	4,476	2,903
900	40,0	4,747	2,954
1000	93,3	6,476	3,000

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 857,2 mg/l.

Všechny výše uvedené hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro penicilin G, které byly získány prostřednictvím jednotlivých ekotoxikologických testů, jsou pro přehlednost prezentovány v tabulce 53. Červeně zvýrazněné jsou hodnoty LC25, EC25 a IC25, které byly stanovovány v případě nemožnosti určení hodnot LC50, EC50 a IC50.

Tabulka 53: Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro penicilin G.

Testovací organismus	Stanovovaná hodnota	Penicilin G (mg/l)
<i>Sinapis alba</i>	72hIC50	653,4
<i>Daphnia magna</i>	24hEC25	874,4
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50	878,5
<i>Artemia salina</i>	48hLC50	797,2
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24hLC50	857,2
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	–

5.6. Ampicilin

5.6.1. Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba*

Předběžný test byl proveden s roztoky ampicilinu o koncentracích uvedených v tabulce 9. Naměřené hodnoty z předběžného testu jsou zaznamenány v tabulce 54.

Tabulka 54: Předběžný test inhibice růstu kořene hořčice bílé.

c (mg/l)	Průměrná délka kořene L (mm)	Inhibice růstu kořene I (%)	log c
0	36,0	0	
100	30,3	15,8	2,000
250	28,6	20,6	2,398
500	24,8	31,1	2,699
750	24,0	33,3	2,875
1000	21,3	40,8	3,000

Protože nejvyšší koncentrace 1000 mg/l nezpůsobila úmrtnost přesahující 50 %, nebyl prováděn dále základní test. Byla alespoň stanovena hodnota 72hIC₂₅ u předběžného testu, která činila 286,7 mg/l.

5.6.2. Daphtoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 10. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 55. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 55: Předběžný test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	0
100	0	10,0	0	3,718	2,000
250	5,0	20,0	3,355	4,158	2,398
500	15,0	25,0	3,964	4,326	2,699
750	20,0	30,0	4,158	4,476	2,875
1000	40,0	75,0	4,747	5,674	3,000

Porovnáním zjištěných hodnot z tabulky 55 stanovených po 24 a 48 hodinách testování bylo určeno rozmezí základního testu. Použitá koncentrační řada pro základní test je uvedená v tabulce 10. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 56.

Tabulka 56: Základní test na organismu *Daphnia magna*.

c (mg/l)	Mortalita (%)		Probity		log c
	24 hodin	48 hodin	24 hodin	48 hodin	
0	0	5,0	0	3,355	0
750	20,0	4,158	30,0	4,476	2,875
850	25,0	4,326	45,0	4,874	2,929
900	30,0	4,476	60,0	5,253	2,954
950	40,0	4,747	70,0	5,524	2,978
1000	40,0	4,747	80,0	5,842	3,000

Hodnota 48hEC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 850,5 mg/l. Hodnota 24hEC50 nebyla stanovena, protože nejvyšší koncentrace 1000 mg/l nezpůsobila úmrtnost přesahující 50 %. Byla tedy alespoň stanovena hodnota 24hEC25, která činila 823,2 mg/l.

5.6.3. Akutní test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 12. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 57. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 57: Předběžný test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	0	0	
100	10,0	3,718	2,000
200	13,3	3,874	2,301
400	16,7	4,046	2,602
800	40,0	4,747	2,903
1000	83,3	5,954	3,000

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 12. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 58.

Tabulka 58: Základní test na organismu *Artemia salina*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
700	13,3	3,874	2,845
750	30,0	4,476	2,875
800	46,7	4,925	2,903
900	60,0	5,253	2,954
1000	86,7	6,126	3,000

Hodnota 48hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 833,0 mg/l.

5.6.4. Thamnotoxkit FTM

Předběžný test byl proveden s roztoky o koncentracích uvedených v tabulce 13. Získané hodnoty z předběžného testu jsou uvedeny v tabulce 59. Spolu s testovanou látkou byla hodnocena i kontrola, ve které nepřesáhla mortalita hranici 10 %.

Tabulka 59: Předběžný test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	6,7	3,524	
100	3,3	3,188	2,000
250	10,0	3,718	2,398
500	30,0	4,476	2,699
750	56,7	5,176	2,875
1000	80,0	5,842	3,000

Na základě výsledků předběžného testu bylo stanoveno rozmezí koncentrací pro základní test. Použitá koncentrační řada je uvedená v tabulce 13. Získané výsledky ze základního testu jsou uvedeny v tabulce 60.

Tabulka 60: Základní test na organismu *Thamnocephalus platyurus*.

c (mg/l)	Mortalita (%)	Probity	log c
0	3,3	3,188	
500	36,7	4,668	2,699
600	40,0	4,747	2,778
650	50,0	5,000	2,813
750	56,7	5,176	2,875
900	73,3	5,613	2,954

Hodnota 24hLC50 byla zjištěna z grafické závislosti probitových hodnot na logaritmech koncentrace pomocí regresní přímky a činila 650,3 mg/l.

Všechny výše uvedené hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro ampicilin, které byly získány prostřednictvím jednotlivých ekotoxikologických testů, jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 61. Červeně zvýrazněné jsou hodnoty LC25, EC25 a IC25, které byly stanovovány v případě nemožnosti určení hodnot LC50, EC50 a IC50.

Tabulka 61: Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro ampicilin.

Testovací organismus	Stanovovaná hodnota	Ampicilin (mg/l)
<i>Sinapis alba</i>	72hIC25	286,7
<i>Daphnia magna</i>	24hEC25	823,2
<i>Daphnia magna</i>	48hEC50	850,5
<i>Artemia salina</i>	48hLC50	833,0
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24hLC50	650,3
<i>Lemna minor</i>	168hIC50	–

6. DISKUZE VÝSLEDKŮ

V rámci diplomové práce byla stanovena a hodnocena ekotoxicita vybraných farmak. Testována byla tato léčiva: diklofenak, ibuprofen, penicilin G a ampicilin, která byla podrobena celkem šesti testům ekotoxicity. Pro testování byly použity čtyři testy na vodních bezobratlých organismech a dva testy fytotoxicity. Mezi testy na bezobratlých patřily Rotoxkit FTM na testovacím organismu *Brachionus calyciflorus*, Thamnotoxkit FTM na testovacím organismu *Thamnocephalus platyurus*, Daphtoxkit FTM na testovacím organismu *Daphnia magna* a test toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*. Testy fytotoxicity zahrnovaly test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* a test na okřešku menším *Lemna minor*. Na testovacím organismu *Brachionus calyciflorus* byl proveden pouze referenční a limitní test. Předběžné a základní testy jednotlivých léčiv nebyly provedeny z důvodu vyčerpání ampulek s cystami vířníka *Brachionus calyciflorus* při referenčních a limitních testech.

Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou. K ověření správnosti postupů, klíčivosti semen a citlivosti organismů byly provedeny referenční testy se standardní látkou dichromanem draselným K₂Cr₂O₇. Pro okřehek menší byl podle požadavků normy použit jako standard chlorid draselný KCl. Výsledné hodnoty referenčních testů pro oba standardy byly ve shodě s výsledky odpovídajícími těmto standardům. Veškeré postupy bylo tedy možné použít pro hodnocení ekotoxicity vybraných farmak.

Pro lepší porovnání a zhodnocení výsledků byly získané hodnoty shrnuty do následující tabulky a grafů. V tabulce 62 jsou pro přehlednost prezentovány všechny výsledné hodnoty LC₅₀, EC₅₀ a IC₅₀ pro testované látky. Červeně zvýrazněné jsou hodnoty LC₂₅, EC₂₅ a IC₂₅, které byly stanovovány v případě nemožnosti určení hodnot LC₅₀, EC₅₀ a IC₅₀.

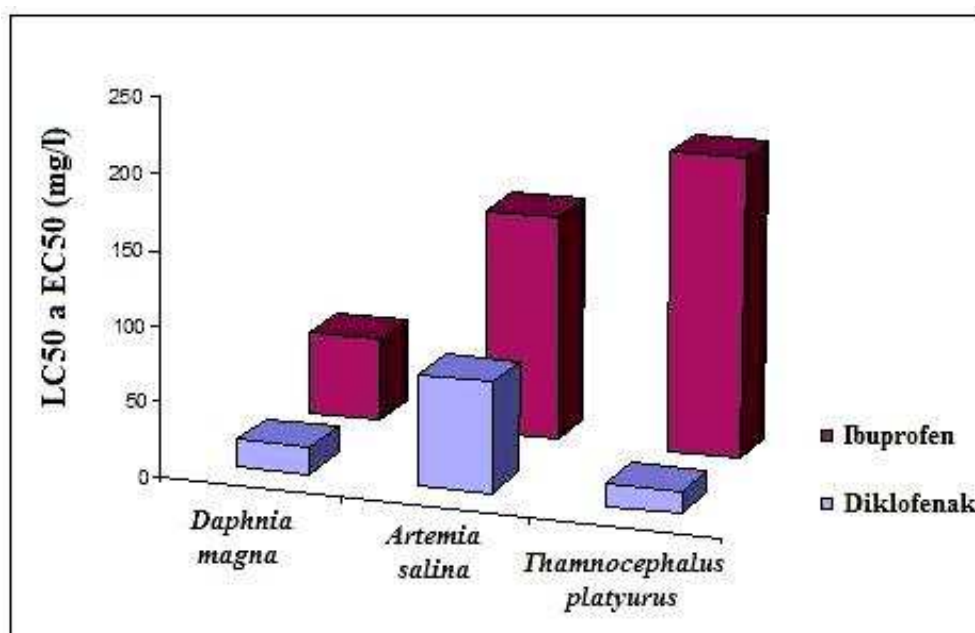
Tabulka 62: Výsledné hodnoty LC₅₀, EC₅₀ a IC₅₀ testovaných farmak.

	Diklofenak (mg/l)	Ibuprofen (mg/l)	Penicilin G (mg/l)	Ampicilin (mg/l)
<i>Sinapis alba</i> (72hIC ₅₀)	83,8	122,2	653,4	286,7
<i>Daphnia magna</i> (24hEC ₅₀)	53,0	106,4	874,4	823,2
<i>Daphnia magna</i> (48hEC ₅₀)	17,2	56,4	878,5	850,5
<i>Artemia salina</i> (48hLC ₅₀)	74,0	151,2	797,2	833,0
<i>Thamnocephalus platyurus</i> (24hLC ₅₀)	15,2	200,8	857,2	650,3
<i>Lemna minor</i> (168hIC ₅₀)	169,4*	195,9*	–	–
<i>Lemna minor</i> (168hIC ₅₀)	142,2**	165,5**	–	–

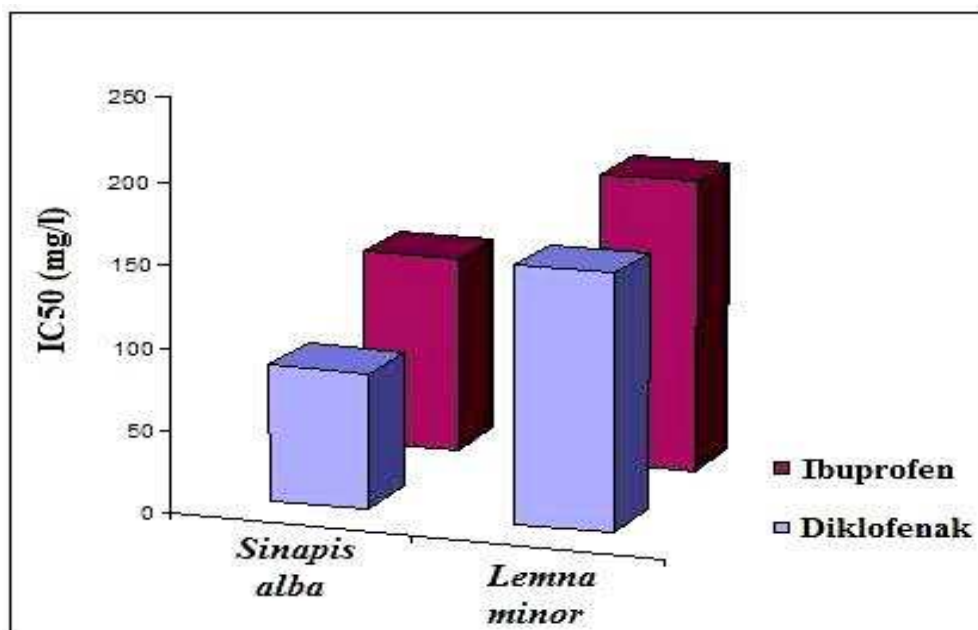
* metoda porovnání rychlosti růstu

** metoda porovnání hmotnosti konečné biomasy

Z uvedených výsledků testovaných léčiv vyplývá, že nejvyšší ekotoxická byla prokázána u diklofenaku. Nejnížší hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro diklofenak byly stanoveny ve všech provedených testech. O něco nižší ekotoxicitu a tedy o něco vyšší hodnoty LC50, EC50 a IC50 vykazoval ibuprofen, což bylo opět prokázáno u všech testů ekotoxicity. Pro lepší porovnání ekotoxity těchto dvou nesteroidních protizánětlivých látek byly sestaveny dva grafy. V grafu 1 je znázorněno porovnání výsledků testů na vodních bezobratlých organismech a v grafu 2 porovnání výsledků fytotestů. Z grafů jednoznačně vyplývá, že hodnoty LC50, EC50 a IC50 pro diklofenak jsou oproti ibuprofenu nižší. Nejvyšší rozdíl v ekotoxicitě těchto dvou léčiv byl patrný v případě 24 hodinového testu na vodním korýši *Thamnocephalus platyurus* a nejnižší v případě testu na okřehekku menším *Lemna minor*.



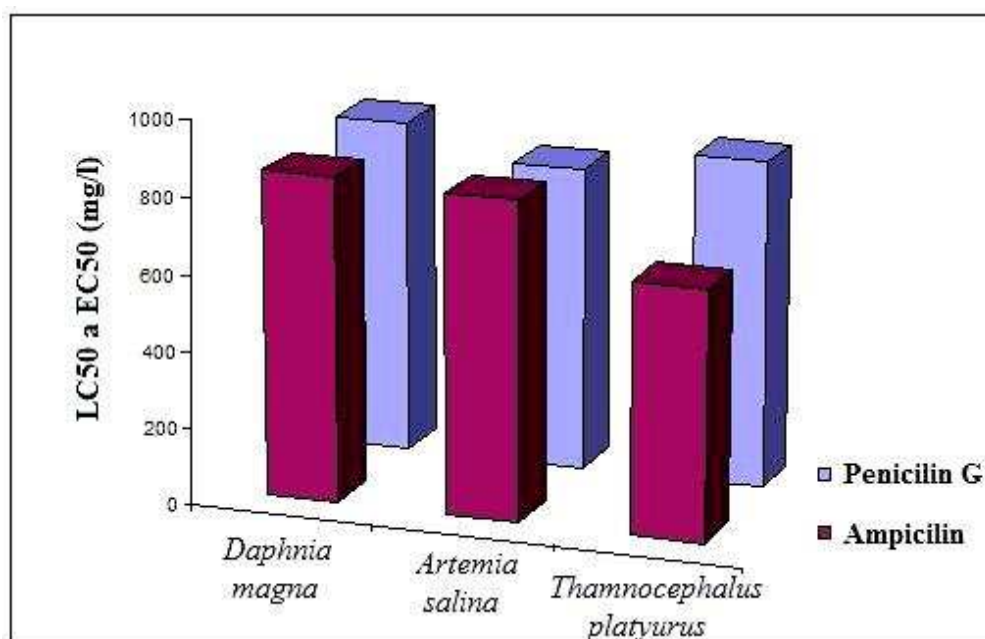
Graf 1: Porovnání hodnot LC50 a EC50 diklofenaku a ibuprofenu.



Graf 2: Porovnání hodnot IC50 diklofenaku a ibuprofenu.

Z grafů 1 a 2 vyplývá nejen již výše zmiňovaná vyšší ekotoxicita diklofenaku oproti ibuprofenu, ale také citlivost jednotlivých testovacích organismů. Při posuzování ekotoxicity nesteroidních protizánětlivých látek byla nejcitlivějším organismem z řady bezobratlých *Daphnia magna*, z rostlinných organismů se méně citlivým projevil okřehek menší *Lemna minor*. Z grafů také vyplývá, že testy na akvatických organismech jsou citlivější, než testy využívající jako testovací organismus vyšší rostliny.

Z výsledků testovaných léčiv uvedených v tabulce 62 dále vyplývá, že nejnižší ekotoxicita byla prokázána pro látky ze skupiny antibiotik tedy u penicilinu G a ampicilinu. Pro lepší porovnání ekotoxity těchto dvou antibakteriálních látek byl sestaven graf 3, kde jsou znázorněny výsledky provedených ekotoxikologických testů na vodních bezobratlých.



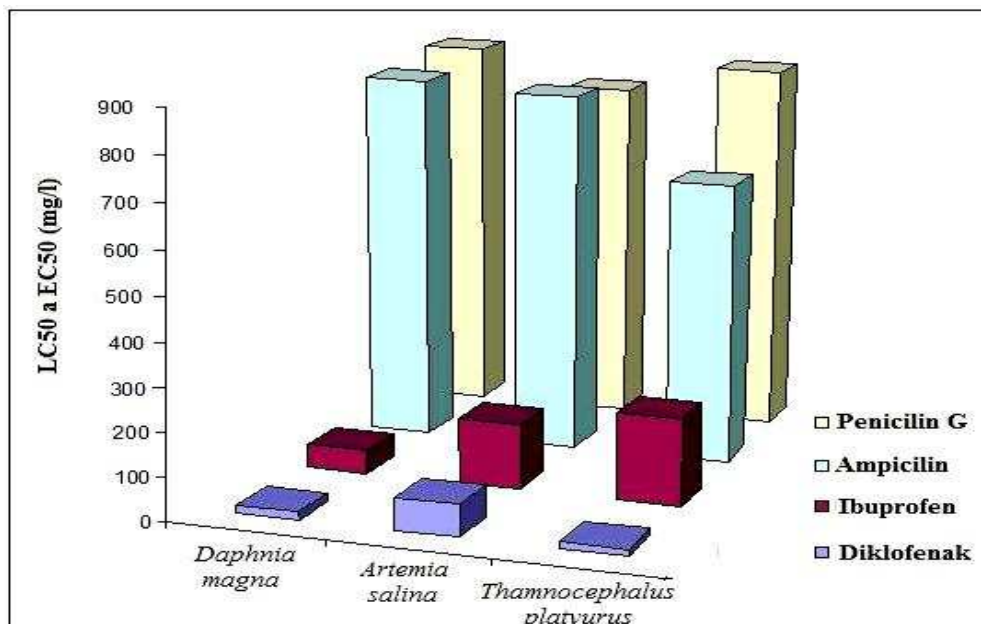
Graf 3: Porovnání hodnot LC50 a EC50 penicilinu G a ampicilinu.

Z grafu je patrné, že ve skupině antibiotik nelze zcela jednoznačně určit látku, která vykazuje vyšší ekotoxicitu. V případě testu na organismech *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus* vykazoval penicilin G vyšší hodnoty LC50 a EC50 a tedy nižší ekotoxicitu oproti ampicilinu. Naopak v testu na žábronožkách *Artemia salina* vykazoval penicilin G nižší hodnoty LC50, EC50 a IC50 a tedy mírně vyšší ekotoxicitu než ampicilin.

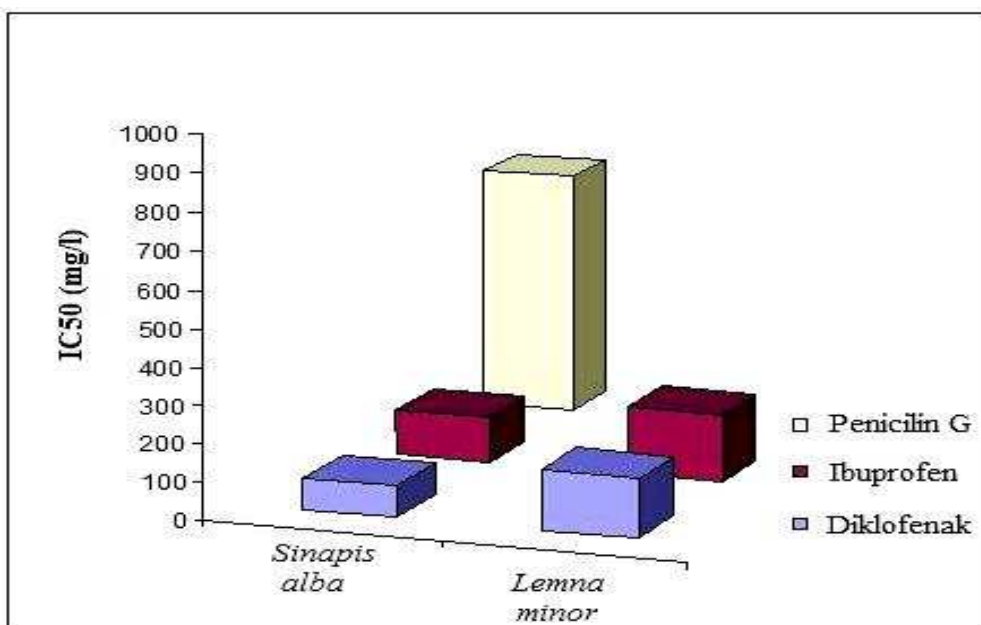
Provedeným fytotestem ve skupině antibiotik byl pouze test na hořčici bílé *Sinapis alba*, testování penicilinu G a ampicilinu na okřehek menším *Lemna minor* z důvodu malého množství testované látky nebylo provedeno. Hodnota 72hIC50 penicilinu G u testu na organismu *Sinapis alba* byla stanovena na 653,4 mg/l. U ampicilinu tato hodnota nebyla stanovena, protože ani nejvyšší testovaná koncentrace 1 g/l nezpůsobila inhibici přesahující 50 %. Proto byla stanovena alespoň hodnota 72hIC25, která činila 286,7 mg/l.

V grafu 4 a 5 jsou znázorněny hodnoty LC50, EC50 a IC50 všech čtyř testovaných léčiv. Z těchto hodnot můžeme porovnat rozdíl mezi ekotoxicitou nesteroidních protizánětlivých látek a antibiotik, který je poměrně značný. Z grafů jednoznačně vyplývají nižší hodnoty LC50, EC50 a IC50 a tedy vyšší ekotoxicita diklofenaku a ibuprofenu oproti penicilinu G a ampicilinu. Mnohonásobně vyšší hodnoty LC50, EC50 a IC50 u antibakteriálních látek byly shodně potvrzeny ve všech provedených testech ekotoxicity. Největší rozdíl v ekotoxicitě

obou skupin léčiv byl patrný v případě 48 hodinového testu na vodním korýši *Daphnia magna*. Z uvedených skutečností můžeme konstatovat, že testované nesteroidní protizánětlivé látky vykazují poměrně vyšší ekotoxicitu než testovaná antibiotika a tudíž představují větší ekotoxikologické nebezpečí pro životní prostředí.



Graf 4: Porovnání hodnot LC50 a EC50 diklofenaku, ibuprofenu, penicilinu a ampicilinu.



Graf 5: Porovnání hodnot IC50 diklofenaku, ibuprofenu, penicilinu G a ampicilinu.

Z grafů 4 a 5 dále vyplývá citlivost testovacích organismů. Posouzení citlivosti jednotlivých organismů v rámci všech čtyř testovaných léčiv však není zcela jednoznačné. Například organismus *Daphnia magna* při testování nesteroidních protizánětlivých látek vykazoval nejvyšší citlivost, avšak v případě testování antibakteriálních látek se jevil jako nejméně citlivý. Na základě uvedených skutečností můžeme konstatovat, že citlivost testovacích organismů v závislosti na testovaném léčivu byla velmi proměnlivá.

7. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na ekotoxikologické hodnocení farmak. K testování byla vybrána celkem čtyři léčiva, dvě ze skupiny nesteroidních protizánětlivých látek a dvě ze skupiny antibiotik. Ze skupiny nesteroidních protizánětlivých látek byli jako zástupci vybráni diklofenak a ibuprofen a ze skupiny antibiotik penicilin G a ampicilin.

- V teoretické části diplomové práce byla zpracována literární rešerše zaměřující se na léčiva. Byly zde popsány vlastnosti vybraných léčiv a jejich osud v životním prostředí. Další část byla zaměřena na ekotoxikologické testování a testy ekotoxicity, které byly využity pro ekotoxikologické hodnocení léčiv.
- K ekotoxikologickému hodnocení vybraných léčiv byly použity čtyři testy na vodních bezobratlých organismech a dva testy fytotoxicity. Testovanými organismy byly *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus* a *Artemia salina*. Testy fytotoxicity zahrnovaly test inhibice růstu kořene hořčice bílé *Sinapis alba* a test na okřehku menším *Lemna minor*.
- Všechny testy byly provedeny v souladu s danou metodikou. Korektnost všech prováděných testů a citlivost testovaných organismů byla ověřena referenčními testy. Standardní testovanou látkou pro kontrolu kvality byl dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$ a pro test na okřehku menším chlorid draselný KCl. Výsledné hodnoty LC50, EC50 a IC50 dichromanu draselného a chloridu draselného splňovaly limity pro dané standardy.
- Z testovaných léčiv vykazoval jednoznačně nejvyšší ekotoxicitu diklofenak a to ve všech provedených testech. O něco nižší ekotoxicitu a tedy o něco vyšší hodnoty LC50, EC50 a IC50 vykazoval ibuprofen a to opět u všech testů ekotoxicity. Řádově vyšší hodnoty LC50, EC50 a IC50 a tedy i nejnižší ekotoxicitu vykazoval penicilin G a ampicilin, což bylo opět shodně potvrzeno všemi provedenými testy. Rozdíly mezi zjištěnými ekotoxikologickými hodnotami penicilinu G a ampicilinu byly nepatrné.
- Porovnáním ekotoxicity diklofenaku a ibuprofenu, jako skupiny nesteroidních protizánětlivých látek se skupinou antibiotik, penicilinu G a ampicilinu, můžeme vyvodit jednoznačný závěr. Diklofenak s ibuprofenem vykazují mnohem nižší hodnoty LC50, EC50 a IC50 oproti penicilinu G a ampicilinu a lze tedy konstatovat, že představují větší ekotoxikologické nebezpečí pro životní prostředí.
- V rámci testů fytotoxicity se citlivějším organismem jevila *Sinapis alba*.
- V případě alternativních testů s vodními bezobratlými organismy nelze jednoznačně určit nejcitlivější organismus. Při posuzování ekotoxicity nesteroidních protizánětlivých látek necitlivěji reagoval organismus *Daphnia magna*. V případě posuzování ekotoxicity antibakteriálních látek byla citlivost organismů proměnlivá v závislosti na testovaném léčivu.

Závěrem lze říci, že testy ekotoxicity jsou velmi cenným nástrojem, který umožňuje odhadnout efekty látek na životní prostředí. Přestože z obou skupin testovaných látek skupina antibiotik vykazovala mnohem menší ekotoxicitu, je třeba se problematikou léčiv dále zabývat i s ohledem na jejich biologické účinky.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JJEMBA, P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006, vol. 63, is. 1, pp. 113-130.
- [2] KOLPIN, D.W., et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*. 2002, vol. 36, no. 6, pp. 1202-1211.
- [3] TERNES, T. A., et al. Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment. *Environ. Sci. Technol.*. 2002, vol. 36, no. 17, pp. 3855-3863.
- [4] KOSJEK, T., HEATH, E., KOMPARE, B. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007, vol. 387, no. 4, pp. 1378-1387.
- [5] TIXIER, C., et al. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental science & technology*. 2003, vol. 37, no. 6, pp. 1061-1068.
- [6] 3. čtvrtletí 2008, Státní ústav pro kontrolu léčiv: [online]. 2007 , 16.2.2009 [cit. 2009-02-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.sukl.cz/3-ctvrtleti-2008>>.
- [7] TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research*. 1998, vol. 32, is. 11, pp. 3245-3260.
- [8] WATTS, M., PASCOE, D., KATHLEEN, C. Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, vol. 54, is. 2, pp. 207-215.
- [9] HIRSCH, R. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of The Total Environment*. 1999, vol. 225, is. 1-2, pp. 109-118.
- [10] DOERR-MACEWEN, N. A., HAIGHT, M. E. Expert stakeholders' views on the management of human pharmaceuticals in the environment. *Environmental management*. 2006, vol. 38, no. 5, pp. 853-866.
- [11] FERRARI, B., et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, vol. 55, no. 3, pp. 359-370.
- [12] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha: Grada publishing, 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.
- [13] TICHÝ, M.: *Toxikologie pro chemiky: Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 118 s. ISBN 80-246-0566-X.
- [14] Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů.
- [15] HAMPL, F., PALEČEK, J.: *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2002. 413 s. ISBN 80-7080-495-5.
- [16] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. dopl. vyd. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [17] Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech).
- [18] HYNIE, S.: *Základy farmakologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 1999. 368 s. ISBN 80-7254-048-3.

- [19] BOROVSANÝ, A., BENEŠ, L.: *Farmaceutická chemie 2: Léčiva s účinkem na centrální a periferní nervový systém*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999. 234 s. ISBN 80-85114-78-X.
- [20] PACE 2010 [online]. 2009 , 16.2.2009 [cit. 2009-02-16]. Dostupný z WWW: <http://www.pace.cz/go/archiv_p0202_1>.
- [21] BARDEN, J., et al. Single dose oral diclofenac for postoperative pain. *Cochrane database of systematic reviews*. 2004, is. 2, pp. 47-68.
- [22] *Monoflam retard (diclofenacum natricum)* [online]. 2008, 29.12.2008 [cit. 2008-12-29]. Dostupný z WWW: <http://cz.sanofi-aventis.com/produkty/monoflam_retard_pil.pdf>.
- [23] *DICLOREUM tbl obd 30x50mg*: www.lekarnauhradeb.cz [online]. Fill SW servis s.r.o, 2009, 2.1.2009 [cit. 2009-01-02]. Dostupný z WWW: <http://www.lekarnauhradeb.cz/leky/na-predpis/2098-DICLOREUM-tbl-obd-30x50mg-.html/?&from=61&search_nazev=&search_vyrobce=&typ=1&podtyp=&filt=D>.
- [24] ZHANG, Y., GEISEN, S., GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 2008, no. 73, pp. 1151-1161.
- [25] *Český Lékopis 97* [online]. 2007, 23.1.2007 [cit. 2009-02-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.lekopis.cz/Default.htm>>.
- [26] CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 2002, no. 142, pp. 185-194.
- [27] SCHEYTT, T. J., MERSMANN, P., HEBERER, T. Mobility of pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone in miscible-displacement experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*. 2006, no. 83, pp. 53-69.
- [28] SANDERSON, H., THOMSEN, M. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicology Letters*. 2009, vol. 68, no. 1, pp. 1-10.
- [29] HEROTOVÁ, T., BENEŠ, J.: *Co mořná nevíte o antibiotikách* [online]. Praha: 2008, 29.12.2008 [cit. 2008-12-29]. Dostupný z WWW: <http://www.e-bug.eu/ebug.nsf/sci_Co%20%20mo%20C5%BE%20C3%A1%20nev%20C3%ADte%20o%20%20%20ATB-let%20C3%A1k.doc>.
- [30] ČÍŽKOVÁ, V.: *Vážíme si antibiotik?* Brno: Masarykova univerzita v Brně, Fakulta lékařská, 2007. 68 s. Vedoucí bakalářské práce MUDr. Lenka Dostalová Kopečná, Ph.D.
- [31] HAVLÍK, J.: Současné možnosti "starších" antibiotik v terapeutické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, roč. 17, č. 3, s. 183-185.
- [32] HYNIE, S.: *Medicabáze.cz - váš online lékařský slovník: Detail hesla* [online]. 2009, 2.1.2009 [cit. 2009-01-02]. Dostupný z WWW: <http://www.medicabaze.cz/?&sec=term_detail&termId=371&tname=Peniciliny>.
- [33] ARSLAN-ALATON, I., CAGLAYN, A. Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent. *Environmental safety*. 2006, no. 63, pp. 131-140.
- [34] MIGLIORE, L., et al. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Wat. res.*. 1996, vol. 31, no. 7, pp. 1801-1806.

- [35] WOLLENBERGER, L., HALLING-SORENSEN, B., KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2000, no. 40, pp. 723-730.
- [36] HOFFMAN, D. J., et al. *Handbook of ecotoxicology*. 2: Lewis publishers, 2003. 1290 p. ISBN 1-56670-546-0.
- [37] HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*. 2002, vol. 131, no. 1, pp. 5-17.
- [38] BENDZ, D., et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *Journal of hazardous materials*. 2005, vol. 122, no. 3, pp. 195-204.
- [39] DOLL, T. E., FRIMMLE, F. H. Fate of pharmaceuticals—photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*. 2003, vol. 52, is. 10, pp. 1757-1769.
- [40] PROKEŠ, J.: *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. 248 s. ISBN 80-7262-301-X.
- [41] VOPRŠALOVÁ, M., ŽÁČKOVÁ, P.: *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2000. 231 s. ISBN 80-7184-282-6.
- [42] DOSTÁLEK, M., a kol.: *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. 220 s. ISBN 80-247-1464-7.
- [43] KVĚTINA, J., HERINK, J., VOPRŠALOVÁ, M.: *Farmakologie pro farmaceuty 1.díl: Obecná farmakologie*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2003. 109 s. ISBN 80-7305-457-4.
- [44] NEWMAN, M. C., CLEMENTS, W. H.: *Ecotoxicology: A comprehensive treatment*. New York: CRC Press, 2008. 852 p. ISBN 978-0-8493-3357-6.
- [45] HYNIE, S.: *Farmakologie v kostce*. 2. vyd. Praha: Triton, 2001. 520 s. ISBN 80-7254-181-1.
- [46] KÜMMERER, K. Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review. *Chemosphere*. 2002, vol. 45, no. 6, pp. 957-969.
- [47] MÖHLE, E., et al. Examination of the degradation of drugs in municipal sewage plants using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 1999, vol. 27, is. 6, pp. 430-436.
- [48] KLA Varioti, M., MANTZAVINOS, D., KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment international*. 2008, no. 35, pp. 402-417.
- [49] KOČÍ, V.: *Ekotoxikologie: Nauka o účincích toxických látek na životní prostředí* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2003 , 25.4.2009 [cit. 2009-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik2003.pdf>>.
- [50] ČABALA, R.: *Ekotoxikologie: Hranice mezi ekologií a toxikologií?* [online]. Praha: Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta, 2007 [cit. 2009-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/20070806NH1.pdf>>.
- [51] ÚNMZ: *ZKRATKY a jim odpovídající původní názvy a české ekvivalenty* [online]. 2009, 7.1.2009 [cit. 2009-01-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.unmz.cz/cz/files/zkratky.htm>>.
- [52] HORÁK, J., KLUSON, P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2004. 188 s. ISBN 80-7080-548-X.

- [53] KOČÍ, V., RAKOVICKÝ, T., ŠVAGR, A.: *Testy akutní a semichronické toxicity*. Praha: VŠCHT Praha, 2001. 11 s
- [54] MATRKA, M., RUSEK, V.: *Průmyslová toxikologie: Úvod do obecné a speciální toxikologie*. Pardubice: Katedra ochrany životního prostředí FCHT, Univerzita Pardubice, 1991. 157 s. ISBN 80-85113-85-6.
- [55] PROUSEK, J.: *Rizikové vlastnosti látek*. 1. vyd. Bratislava: STU, Bratislava, 2001. 247 s. ISBN 80-227-1497-6
- [56] MARŠÁLEK, B.: *Mikrobiotesty: druhá generace ekotoxikologických biotestů* [online]. Brno: Botanický ústav AV ČR, 2006, 24.10.2006 [cit. 2009-01-27]. Dostupný z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/Prehled_mikrobiotestu.pdf>.
- [57] BLAISE, C. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. *Environmental Toxicology & Water Quality*. 1991, vol. 6, is. 2, pp. 145-155.
- [58] SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VYKUSOVÁ, B.: *Ekotoxikologické hodnocení výluhů tuhých průmyslových odpadů*. Vodňany: VÚRH, 1994. 50 s. ISBN 80-85887-00-2.
- [59] Vyhláška MŽP a MZd č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.
- [60] PERSOONE, G. Cyst-based toxicity tests: 1. A promising new tool for rapid and cost effective toxicity screening of chemicals and effluents. *Zeitschrift fuer angewandte Zoologie*. 1991, vol. 78, no. 2, pp. 235-241.
- [61] AMBROŽOVÁ, J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2003. 195 s. ISBN 80-7080-521-8.
- [62] SKLÁDANKA, J.: *Multimediální učební texty pícninářství* [online]. Brno: Ústav výživy zvířat a pícninářství MZLU, 2006, 22.2.2009 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <<http://old.mendelu.cz/~agro/af/picniny1/uctext/sklady.php?odkaz=horcice.html>>.
- [63] KŘENEK, L.: *Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů* [online]. Praha: MŽP, 2003, 23.2.2009 [cit. 2009-02-23]. Dostupný z WWW: <[http://www.env.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoveni_ekotoxicity/\\$FILE/oodp-MP_ke_stanoveni_ekotoxicity_odpadu-2007.pdf](http://www.env.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoveni_ekotoxicity/$FILE/oodp-MP_ke_stanoveni_ekotoxicity_odpadu-2007.pdf)>.
- [64] *Hořčice bílá* [online]. 2007, 22.1.2007 [cit. 2009-02-24]. Dostupný z WWW: <<http://vfu-www.vfu.cz/fvhe/vegetabilie/plodiny/czech/horcice.htm>>.
- [65] MARŠÁLEK, B.: *Zkouška inhibice Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea): Zkouška akutní toxicity* [online]. Brno: Ekotoxikologické biotesty 2006–RECETOX, 2006, 22.2.2009 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_cviceni/cvicenibiotesty-Dafnia.pdf>.
- [66] *Perloočky, řád koryšů z podtřídy lupenonožců: CoJeCo - Vaše encyklopedie*: [online]. 2000, 6.3.2008 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <http://www.cojeco.cz/index.php?s_term=&s_lang=2&detail=1&id_desc=71880>.
- [67] *Daphnia Magna (water fleas)*: [online]. 2008, 7.4.2008 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.daphnia.webplatez.com/>>.
- [68] *Standard operational procedure: Daphtoxkit FTM magna: Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Belgium: Microbiotests Inc., 1995. 27 p.
- [69] KOČÍ, V., RAKOVICKÝ, T., ŠVAGR, A.: *Test akutní toxicity na žábřonozkách Artemia salina*. Praha: VŠCHT Praha, 2001. 6 s.

- [70] MILHEM, M. M., AL-HIYASAT, A. S., DARMANI, H. Toxicity testing of restorative dental materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Journal of applied oral science*. 2008, vol. 4, no. 16, pp. 297-301.
- [71] SKLENÁŘ, Z., DVOŘÁK, P., BEŇOVÁ, K.: Možnosti využití biotestu s *Artemia salina* při studování toxikologických účinků inhibitorů cyklin-dependentních kináz. *Farmakol Farm*. 2006, č. 20, s. 62-65.
- [72] MARŠÁLEK, B., NAGYOVÁ, V., MALÁ, J.: *Možnosti předúpravy vzorků pro ekotoxikologické biotesty: Příklad ekotoxicity cyanotoxinů* [online]. Brno: 2008 , 29.12.2008 [cit. 2008-12-29]. Dostupný z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/PredupravaVzorkuEB2.pdf>.
- [73] PERSOONE, G., JANSSEN, C., DE COEN, W. Cyst-based toxicity tests X: Comparison of the sensitivity of the acute *Daphnia magna* test and two crustacean microbiotests for chemicals and wastes. *Chemosphere*. 1994, no. 29, pp. 2701-2710
- [74] *BIOHIDRICA® RAPIDTOXKIT assay* [online]. 2007 , 22.9.2007 [cit. 2009-02-27]. Dostupný z WWW: <http://www.biohidrica.cl/assay_rapidtoxkit.htm>.
- [75] *Beavertail Fairy Shrimp* [online]. 2009, 4.1.2009 [cit. 2009-02-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.arizonafairyshrimp.com/beavertailfairy.html>>.
- [76] *Standard operational procedure: Thamnotoxkit FTM: Crustacean toxicity screening test for freshwater*. Belgium: Microbiotests Inc., 1995. 28 p.
- [77] ŠVAGR, A., JIRKŮ, J.: *Test toxicity při semichronické expozici vůči okřešku menšímu (Lemna minor)*. Praha: VŠCHT Praha, 2003. 10 s.
- [78] *Lemna on Flickr - Photo Sharing* [online]. 2008, 8.3.2009 [cit. 2009-03-08]. Dostupný z WWW: <<http://www.flickr.com/photos/smorissette/1412642927/>>.
- [79] SVOBODOVÁ, Z., et al. *Ekotoxikologie: praktická cvičení část I.* 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2000. 72 s. ISBN 80-85114-95-X.
- [80] ČSN EN ISO 20079. *Jakost – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) – Zkouška inhibice růstu okřešku*. Praha: Český normalizační institut, 2007. 28 s.
- [81] *BIOHIDRICA® ROTOXKIT F assay* [online]. 2009, 3.5.2009 [cit. 2009-05-03]. Dostupný z WWW: <http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit_f-protocol01.pdf>.
- [82] KADLEC, T.: *Vířníci: Stránky o vířnících se zaměřením na Českou republiku* [online]. 2006, 4.5.2009 [cit. 2009-05-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.upb.cas.cz/pracovnici/devetter/databaze/index.php?ev=1&article=2>>.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CNS	centrální nervový systém
NSPZL	nesteroidní protizánětlivé látky
$t_{1/2}$	eliminační poločas
PBP	penicilin-binding proteins (penicilin vázající proteiny)
PABA	kyselina p-aminobenzoová
ATB	antibiotika
ISO	International Organisation for Standardization (Mezinárodní organizace pro standardizaci)
GLP	Good Laboratory Practice (správná laboratorní praxe)
LD	Lethal Dose (letální dávka)
LC	Lethal Concentration (letální koncentrace)
EC	Effective Concentration (efektivní koncentrace)
IC	Inhibitory Concentration (inhibiční koncentrace)
NOEC	No Observed Effect Concentration (koncentrace nevyvolávající viditelný efekt)
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (nejnižší koncentrace s pozorovatelnými efekty)
OC ₀	orientační koncentrace 0
OC ₁₀₀	orientační koncentrace 100
ČOV	čistička odpadních vod
DFC	diklofenak
GIT	gastrointestinální trakt
ČSN	Česká technická norma
EN	Evropská norma
ASTM	American Society for Testing and Materials (Americká společnost pro testování a materiály)
ČR	Česká republika
DMSO	dimethylsulfoxid
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development (Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj)
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
K ₂ Cr ₂ O ₇	dichroman draselný
KCl	chlorid draselný

10. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Převedení úmrtnostních dat v procentech na probity. [53]

%	probity	%	probity	%	probity	%	probity
0,2	2,122	21,0	4,194	52,0	5,050	83,0	5,954
0,4	2,348	22,0	4,228	53,0	5,075	84,0	5,994
0,6	2,488	23,0	4,261	54,0	5,100	85,0	6,036
0,8	2,591	24,0	4,294	55,0	5,126	86,0	6,080
1,0	2,574	25,0	4,326	56,0	5,151	87,0	6,126
1,2	2,743	26,0	4,357	57,0	5,176	88,0	6,175
1,4	2,803	27,0	4,387	58,0	5,202	89,0	6,227
1,6	2,856	28,0	4,417	59,0	5,228	90,0	6,282
1,8	2,903	29,0	4,447	60,0	5,253	91,0	6,341
2,0	2,946	30,0	4,476	61,0	5,278	92,0	6,405
2,5	3,04	31,0	4,504	62,0	5,305	93,0	6,476
3,0	3,123	32,0	4,532	63,0	5,332	94,0	6,555
3,5	3,188	33,0	4,560	64,0	5,358	95,0	6,645
4,0	3,249	34,0	4,588	65,0	5,385	95,5	6,695
4,5	3,305	35,0	4,615	66,0	5,412	96,0	6,751
5,0	3,355	36,0	4,642	67,0	5,440	96,5	6,812
6,0	3,445	37,0	4,668	68,0	5,468	97,0	6,881
7,0	3,524	38,0	4,695	69,0	5,496	97,5	6,966
8,0	3,595	39,0	4,722	70,0	5,524	98,0	7,054
9,0	3,659	40,0	4,747	71,0	5,553	98,2	7,096
10,0	3,718	41,0	4,772	72,0	5,583	98,4	7,144
11,0	3,773	42,0	4,798	73,0	5,613	98,6	7,197
12,0	3,825	43,0	4,824	74,0	5,643	98,8	7,257
13,0	3,874	44,0	4,849	75,0	5,674	99,0	7,326
14,0	3,920	45,0	4,874	76,0	5,706	99,2	7,409
15,0	3,964	46,0	4,900	77,0	5,739	99,4	7,512
16,0	4,006	47,0	4,925	78,0	5,772	99,6	7,652
17,0	4,046	48,0	4,950	79,0	5,806	99,8	7,878
18,0	4,085	49,0	4,975	80,0	5,842	100,0	8,090
19,0	4,122	50,0	5,000	81,0	5,878		
20,0	4,158	51,0	5,025	82,0	5,915		